



Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des lymphocytes T CD8+/CD103+ infiltrant les tumeurs pulmonaires humaines

Brahim Fayçal Djenidi

► To cite this version:

Brahim Fayçal Djenidi. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des lymphocytes T CD8+/CD103+ infiltrant les tumeurs pulmonaires humaines. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T044 . tel-01359169

HAL Id: tel-01359169

<https://theses.hal.science/tel-01359169>

Submitted on 2 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 :

DE CANCÉROLOGIE

Laboratoire : INSERM U753

GUSTAVE ROUSSY

114, rue Edouard Vaillant

94805 Villejuif Cedex

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par

Brahim Fayçal DJENIDI

**CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET FONCTIONNELLE DES
LYMPHOCYTES T CD8⁺/CD103⁺ INFILTRANT LES TUMEURS
PULMONAIRES HUMAINES**

Date de soutenance : 23/09/2014

Composition du jury :

Président :	Dr. David PLANCHARD	MD, PhD (Gustave Roussy, Villejuif)
Directrice de thèse :	Dr. Fathia MAMI-CHOUAIB	DR2 (Gustave Roussy, Villejuif)
Rapporteurs :	Dr. Armelle PREVOST-BLONDEL	DR2 (Institut Cochin, Paris)
	Dr. Maha AYYOUB	DR2 (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes)
Examineur :	Dr. Vassili SOUMELIS	MD, PhD (Institut Curie, Paris)

*A ma Grand-Mère,
A mon Grand-Père,
Lah yerahimek,
Tu es parti beaucoup trop tôt
Mais tu resteras à tout jamais dans mon cœur.*

*À papa, maman, que j'aime tant,
C'est grâce à votre amour et soutien que je suis arrivé jusque là.*

*A mes sœurs, Manel et Fifi que j'aime tant,
A mon joueur de foot préféré, mon petit frère Badis.*

A Meriouma

Je remercie le Dr David Planchard qui a accepté de présider ce jury. Un grand merci aux Dr Maha Ayyoub et Dr Armelle Blondel qui ont bien voulu prendre le temps de corriger et de réviser mon manuscrit malgré leur emploi du temps chargé.

J'adresse également tous mes remerciements au Dr Vassili Soumelis qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury en qualité d'examineur.

J'adresse tous mes respects au Dr salem Chouaib et le remercie de m'avoir accueilli dans l'Unité 753 qu'il dirige.

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le Dr Fathia Mami-Chouaib. Je n'oublierai jamais que c'est vous qui m'avez donné l'opportunité de devenir docteur, vous qui avez cru en moi plus que je ne croyais en moi-même. Certaines personnes savent qu'elles sont capables, mais d'autres comme moi, ont besoin d'être encouragées. Vous avez été cette personne qui, tout au long de ma thèse, m'a redonné confiance en ma qualité de scientifique et m'a permis notamment d'acquérir une autonomie dans mon travail de recherche. Je vous remercie Fathia pour tous vos encouragements incessants qui m'ont souvent permis de surmonter de nombreux obstacles. Je vous remercie pour votre présence assidue et le temps que vous m'avez accordé pour l'écriture du papier et pour la correction de mon manuscrit de thèse malgré votre emploi du temps très chargé.

Je remercie également le Dr Saoussen Karray et Dr Sophie Gad pour nos discussions et leur bonne humeur.

Je remercie à aussi le Pr Karim Benihoud pour sa disponibilité, sa gentillesse ainsi que ses conseils avisés.

Je ne veux pas oublier de remercier les nombreuses personnes avec qui j'ai pu collaborer tout au long de ma thèse : Dr Pierre Validire, Dr Vincent de Montpreville, Dr Guillaume Maurice, Dr Julien Adam, Dr Aicha Goubar. Toutes ces personnes ont contribué à mon évolution et à ma maturation scientifique et je n'aurais jamais pu réaliser mon travail de thèse sans leur aide et leur générosité.

Un grand merci à Christine Leroy pour sa gentillesse, pour son écoute et pour son aide précieuse quand j'en avais vraiment besoin. Tu as toujours été là pour nous aider administrativement et humainement. Merci pour ton aide et surtout pour tes encouragements.

Stephanie Buart, quoi dire.... Une amie, Une confidente, Une grande sœur. Merci pour toutes ces années, merci pour tous les bons moments qu'on a pu partager, merci d'avoir été toujours à mes côtés dans le bon comme dans le pire. J'ai pu découvrir que tu étais sûrement une des personnes les plus gentilles et serviables que je connaisse. Que de souvenirs remplis de larmes et que de rires avons-nous partagés ?!!! Je te souhaite le meilleur pour ton avenir (Ingénieur Etude, Nchallah). Merci pour cette merveilleuse tarte au citron que seule toi sais si bien faire et désolé pour toutes les fois que je me suis défilé pour faire un footing avec toi (j'ai l'âme d'un sportif mais le corps d'un dormeur).

J'adresse un grand merci à la Fathia's Team, pour les bons moments que nous avons passés tous ensemble :

Je remercie Isabelle Vergnon pour m'avoir initié à la paillasse dans les règles de l'art, et surtout pour son extrême gentillesse et pour m'avoir soutenu lors des moments difficile !

Un grand merci pour M'barqa Mokrani, Une grande sœur, une Amie. Je n'oublierai jamais à quel point tu m'as encouragé pour que je réalise ma thèse, et ton aide précieuse au cours de celle-ci. Je te remercie pour m'avoir conseillé et ouvert les yeux lorsque je passais par des moments difficiles. Dieu est grand, je te le confirme et il nous veut que du bien.

Bien sur, j'exprime toute ma reconnaissance à ceux et celles qui sont partis du labo mais que je n'oublierai jamais. Un grand merci au Dr Mouna Tabbek et au Dr Boubeker Samah. Même si maintenant vous n'êtes plus au laboratoire, je n'oublierai jamais tous ces précieux moments que nous avons passés ensemble, de tous les conseils, scientifiques ou non, que vous m'avez apportés. Je remercie aussi le Dr Houssem Benlalam pour ses conseils, qui m'a permis de mieux gérer mon projet de thèse et comme tu dis Houssem « One, Two, Three Viva L'Algérie ».

Je remercie aussi Aurelie Durgeau et Marie Boutet pour m'avoir accepté de partager avec vous votre pièce de culture et les discussions sulfureuses dans la salle café. Aurelie, comment vais-je faire sans tes Brownies au chocolat dans mes prochain labo ? Marie, tu restes une « énigme ». Je n'ai toujours pas compris comment tu fais pour ingurgiter des grands plats de pâtes sans prendre aucun gramme😊. Bon courage pour la suite de vos carrières.

Je tiens également à remercier particulièrement Gwendoline Gros (la spécialiste des bons plans et des Mangas) et Thouraya Ben Safta (la spécialiste du chocolat, tu devrais être embauchée chez Côte D'or) et Intissar Akalay (la dingue du café) mes voisins de bureau, pour toutes nos discussions. Je vous remercie sincèrement car sans vous, cette fin de thèse aurait été beaucoup plus compliquée. Merci, pour nos fous rires mais aussi pour avoir supporté mon humeur et mes discussions souvent peu passionnantes et surtout vos discussions de filles AYE CARAMBA. Avec vous, j'ai toujours été le vilain petit cochon et bien sur comme je suis le seul mec je ne disais rien. Je remercie dieu de m'avoir donné la patience et la sagesse pour que je puisse vous supporter ☺. Comme le dit un sage Maestro « Toutes les mêmes, Toutes les mêmes, Toutes les mêmes et y'en a marre ».

Je souhaite bon courage à Yasmine Virk qui entre dans sa dernière année de thèse.

Merci à toi Arash NANBAKHSI pour tous les liens streaming que tu m'as passé pour voir les matchs de foot, pour la séance de Ciné « Avatar » un 31 décembre 2011 après le labo « un réveillon de ouf ». Bon courage pour la suite de ta carrière mon ami et arrête de crever toujours ton pneu de ton vélo.

Zaeem Noman, mon donateur de souris et d'anticorps, mon correcteur attitré de mes textes en anglais. Merci pour tous tes conseils et tes discussions qui enflamment la gente féminine. Merci pour tous les bons moments qu'on a pu partager dans la salle café. Reste comme ça, ne change pas, tu es la mascotte du labo.

Je souhaite également bon courage à Linda Ziani et Meriem Hasmin. Je sais à quel point c'est difficile d'être loin de chez soi (Algérie).

Je souhaite aussi remercier affectueusement les nombreuses autres personnes présentes dans le laboratoire et je leur souhaite le meilleur pour la suite : Andrès Titarelli, Jérôme Thierry, Ludiane Gauthier, Jane Muret et Yosra Messai, ainsi que ceux que j'oublierais de citer.

Je souhaite bonne chance aux nouvelles recrues : Stéphane Terry, Stéphanie Cognac et Marine Leclerc malgré le peu du temps qu'on a passé ensemble, j'ai bien apprécié les petits moments passés à discuter.

Abdérémane Abdou, je te remercie pour nos conversations dans la laverie et surtout un grand merci de la part de mes potters et de mon matériel de souris. Bonne continuation dans ta nouvelle vie de technicien.

Merci également à Yann Lecluse et Philippe Rameau pour m'avoir initié à la cytométrie en flux, mais aussi pour leur humour et nos nombreuses discussions.

Merci aussi à Olivia Bawa pour toute son aide dans l'optimisation des marquages d'immunohistochimie, mais aussi pour tous les réactifs que tu m'as dépanné tout au long de ma thèse.

Merci à tous mes amis pour leur soutien.

Je remercie également le cancéropôle Ile de France et l'université de paris 11 pour leurs soutiens financiers, lesquels m'ont permis de finaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions.

Un grand merci à la famille Taieb Ben Abbas, pour m'avoir soutenu tout au long de ma thèse et de m'avoir préparé de très bon plat afin de me remotiver et oublier que je suis loin de ma famille et de mon pays.

Enfin, un grand merci à ma famille qui m'a soutenue de manière inconditionnelle durant ce long parcours universitaire. Papa, Maman, Manel, Fifi et Badis, nous sommes aussi proches que les six doigts de la main et m'éloigner de vous toutes ces années, afin d'aller au bout de mes rêves n'a pas été une décision facile à prendre.

*« Apprend la science pour l'amour de la science, non pas pour le devoir »
Hamdân Benlounissi*

TABLE DES MATIERES

<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>11</i>
<i>TABLE DES ABREVIATIONS.....</i>	<i>12</i>
<i>AVANT-PROPOS.....</i>	<i>15</i>
<i>INTRODUCTION</i>	<i>16</i>
<i>Chapitre I.....</i>	<i>17</i>
<i>I. MISE EN PLACE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE</i>	<i>18</i>
<i>1. L'immunité adaptative.....</i>	<i>18</i>
<i>1.1. Les effecteurs cellulaires de l'immunité adaptative</i>	<i>19</i>
<i>1.1.1. Les cellules dendritiques</i>	<i>19</i>
<i>1.1.2. Les lymphocytes T.....</i>	<i>19</i>
<i>1.1.2.1. Les lymphocytes T CD4⁺</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2.2. Les lymphocytes T CD8⁺</i>	<i>21</i>
<i>2. Rôle des LT CD8⁺ dans la réponse immunitaire spécifique.....</i>	<i>22</i>
<i>2.1. Différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en effecteurs cytotoxiques</i>	<i>22</i>
<i>2.2. La phase effectrice de la réponse immunitaire spécifique</i>	<i>25</i>
<i>2.2.1. Circulation et activation des lymphocytes T CD8⁺</i>	<i>25</i>
<i>2.2.2. La reconnaissance antigénique.....</i>	<i>26</i>
<i>2.2.3. Mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺</i>	<i>27</i>
<i>2.3. Les voies de lyse</i>	<i>29</i>
<i>2.3.1. La voie perforine/granzyme</i>	<i>29</i>
<i>2.3.2. La voie Fas/Fas-L.....</i>	<i>32</i>
<i>3. Mise en place de la réponse immunitaire antitumorale spécifique l'immunosurveillance</i>	<i>34</i>
<i>3.1. Echappement tumoral à l'immunosurveillance</i>	<i>36</i>
<i>3.1.1. Phase d'élimination.....</i>	<i>38</i>
<i>3.1.2. Phase d'équilibre.....</i>	<i>39</i>
<i>3.1.3. Phase d'échappement.....</i>	<i>40</i>
<i>3.2. Mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance</i>	<i>40</i>
<i>3.2.1. Présentation inadéquate des antigènes par les cellules tumorales</i>	<i>43</i>
<i>3.2.2. Inhibition de la réponse immunitaire par les cellules tumorales</i>	<i>44</i>
<i>3.2.2.1. Inhibition de l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques.....</i>	<i>44</i>
<i>3.2.2.1.1. Modulation des molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction avec les lymphocytes T</i>	<i>44</i>
<i>3.2.2.1.2. Défaut de présentation antigénique par les DC.....</i>	<i>45</i>

3.2.2.1.3. Résistance à la lyse	45
3.2.2.1.4. Dysfonctionnement des lymphocytes T CD8 ⁺	47
3.2.2.2. Les mécanismes d'échappement intrinsèques aux cellules tumorales	47
3.2.2.2.1. Production de cytokines immunosuppressives	48
3.2.2.2.2. Immunosuppression exercée par les lymphocytes T régulateurs	49
3.2.2.2.3. Immunosuppression exercée par les cellules myéloïdes suppressives	51
3.2.2.2.4. Les Macrophages Associés aux Tumeurs.....	52
3.2.2.2.5. Les cellules NKT.....	52
Chapitre II	54
II. LES INTEGRINES	55
1. Les intégrines : généralités	55
2. Structure des intégrines.....	57
3. Signalisation « Inside-out » et « Outside-in »	60
4. Activation des intégrines : changement de conformation spatiale	61
5. Caractéristiques et structure de l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$	62
6. Distribution de l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$	63
6.1. Expression de CD103 dans les lymphocytes T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺	63
6.2. Expression de CD103 dans les DC.....	64
6.3. Expression de CD103 dans les cellules Treg.....	65
7. Fonctions de l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$	65
7.1. Rôle de CD103 dans l'adhérence et la rétention des lymphocytes T.....	65
7.2. Rôle de CD103 dans la cytotoxicité induite par les CTL.....	66
8. Signalisation « Outside-in » et « Inside-out » de CD103.....	67
Chapitre III.....	69
III. LES CHECKPOINTS DE LA REPOSE IMMUNITAIRE.....	70
1. Les molécules inhibitrices	72
1.1. PD-1/PD-L1	72
1.1.1 Voie de signalisation de PD-1	73
1.1.2. Les souris déficientes en PD-1.....	74
1.1.3. Les différentes fonctions de PD-1.....	75
1.1.3.1. Rôle de PD-1 dans la tolérance.....	75
1.1.3.2. Rôle de PD-1 dans la réponse immunitaire antitumorale.....	77
1.2. Tim-3/Gal-9	78
1.2.1. Les différentes fonctions de Tim-3.....	79

1.2.1.1. Rôle de Tim-3 dans les pathologies humaines	79
1.2.1.2. Rôle de Tim-3 dans la tolérance.....	80
1.3.1.3. Rôle de Tim-3 dans l'immunité antitumorale.....	81
1.3. CTLA-4.....	83
2. Neutralisation des récepteurs « checkpoints » en immunothérapie	84
Chapitre IV	88
IV. LES CANCERS BRONCHIQUES ET L'IMMUNOTHERAPIE.....	89
1. Les cancers bronchiques	89
1.1. Epidémiologie	89
1.2. Répercussion.....	89
2. Les différents types de cancers broncho-pulmonaires	90
2.1. Les cancers bronchiques à petites cellules	90
2.2. Les cancers bronchiques non à petites cellules	90
2.2.1. L'adénocarcinome bronchique	91
2.2.2. Le carcinome épidermoïde	91
2.2.3. Le carcinome à grandes cellules	91
3. Les facteurs de risques	92
4. Les avancées de l'immunothérapie dans les cancers bronchiques.....	93
OBJECTIF DES TRAVAUX.....	96
RESULTATS	99
1. CD8 ⁺ /CD103 ⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are exhausted tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival of lung cancer patients	101
2. Rôle de l'intégrine CD103 dans le recrutement et la rétention des lymphocytes T CD8 ⁺ au site tumoral dans un modèle in vivo de souris.	148
DISCUSSION.....	158
CONCLUSION.....	173
PROCEDURES EXPERIMENTALES	178
REFERENCES	190

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Différenciation des cellules T CD8 ⁺	23
Figure 2. Structure de la synapse immunologique concentrique.....	28
Figure 3. Différentes voies de mort initiées par le Granzyme B.....	31
Figure 4. La voie de signalisation Fas/Fas-L.....	33
Figure 5. L'immunosurveillance antitumorale.....	35
Figure 6. Le concept de l'immunoediting.....	37
Figure 7. Les 7 propriétés du cancer.....	41
Figure 8. Les différentes voies d'échappement utilisées par les tumeurs.....	42
Figure 9. Représentation de la famille des intégrines.....	55
Figure 10. Structure et régulation de l'affinité des intégrines.....	57
Figure 11 : Modèle de l'interaction entre l'intégrine α_E (CD103) β_7 et la E-cadhérine.....	61
Figure 12. Les molécules checkpoints du système immunitaire.....	70
Figure 13. Voie de signalisation de PD-1.....	73
Figure 14. Les différentes stratégies de blocage des récepteurs inhibiteurs.....	75
Figure 13. Diagramme de l'incidence du cancer du poumon.....	91
Figure 14. Modèle expérimental humain.....	96
Figure 15. Modèle expérimental murin.....	147
Figure 16. Rôle CD103 et de CCL5 dans la réponse immunitaire antitumorale.....	149
Figure 17. Comparaison Croissance tumorales et infiltration antitumorale entre les souris CD103-WT vs CD103-KO.....	152
Figure 18. Caractérisation phénotypique des TIL issus souris CD103-WT vs CD103-KO.....	154
Figure 19. Transfert adoptif des TIL CD8 ⁺ /CD103 ⁺	173
Figure 20. Rôle de la molécule chimioattractant CCL5.....	174

TABLE DES ABREVIATIONS

Aa	<i>Acide aminé</i>
Ac	<i>Anticorps</i>
ADC	<i>Adénocarcinome</i>
Ag	<i>Antigène</i>
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AIF	<i>Allograft inflammatory factor 1</i>
AML	<i>Leucémie aiguë myéloïde</i>
AML	<i>Leucémies myéloïdes aiguës</i>
AND	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
APC	<i>Cellule présentatrice d'Ag.</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ATLL	<i>Leucémie T de l'adulte</i>
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CBNPC	<i>Cancers bronchiques non à petites cellules</i>
CBPC	<i>Cancers bronchiques à petites cellules</i>
CC	<i>Chimiokine</i>
CLL	<i>Leucémie lymphoïdes chroniques</i>
CMH	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i>
CML	<i>Leucémie aiguë Chronique</i>
cSMAC	<i>Central supramolecular activation cluster</i>
CTL	<i>Lymphocyte T cytotoxique</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>
DC	<i>Cellule dendritique</i>
DC-LAMP	<i>Lysosome-associated membrane protein.</i>
DCm	<i>DC myéloïdes</i>
DCp	<i>DC plasmacytoïde</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DETC	<i>Cellule T $\gamma\delta$ dendritique de l'épiderme</i>
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex.</i>
Domaines I	<i>Inserted domain</i>
dSMAC	<i>Distal SMAC</i>
EAE	<i>Expérimental auto-immune encéphalomyélites</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
Fas-L	<i>Fas ligand</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Grz	<i>Granzyme</i>
HEV	<i>High endothelial venules</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>Inducible T-cell COStimulator</i>
IEL	<i>Intestinal intraepithelial lymphocyte</i>
IFN	<i>Interféron</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
IL	<i>Interleukine</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KLRG1	<i>killer-cell lectin like receptor G1</i>
LAMP-1	<i>Lysosome associated membrane protein 1</i>
LAT	<i>Linker of activation of T cell</i>
LB	<i>Lymphocyte B</i>
LCK	<i>Lymphocyte specific protein tyrosine kinase</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function associated antigen-1</i>
LLC	<i>Leucémie Lymphoïde Chronique</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Lymphocytes T</i>
MCA	<i>Carcinogène chimique méthylcholanthrène</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MEC	<i>Matrice extracellulaire</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MIDAS	<i>Metal-ion-dependent adhesion site</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NK	<i>Cellules tueuse naturelle</i>
NKT	<i>Cellule tueuse naturelle T</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecules Patterns.</i>
PBL	<i>Peripheral blood lymphocyte</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein-1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PI-9	<i>Protease inhibitor 9</i>
PKC-q	<i>Protein Kinase-q</i>
PLC-g	<i>Phospholipase C-g</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PR	<i>polyarthrite rhumatoïde</i>
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PT	<i>Toxine pertussique de la coqueluche</i>
PTK	<i>Protéine tyrosine kinase</i>
RCAS1	<i>Receptor-binding Cancer Antigen expressed on Siso cells</i>
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate.</i>
SI	<i>Synapse immunitaire</i>
SNC	<i>Système nerveux central</i>

TAA	<i>Ag associés aux tumeurs</i>
TAM	<i>Macrophages associés aux tumeurs</i>
TCM	<i>Cellule centrale mémoire</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TEM	<i>Cellule T effectrice mémoire</i>
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin mucin-3</i>
TPLSM	<i>Two-photon laser scanning microscopy</i>
Treg	<i>Lymphocyte T régulateur</i>
TRM	<i>Cellule T mémoire résidant dans les tissus</i>
VCAM	<i>Vascular intercellular adhesion molecule.</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>
WAIT-1	<i>WD protein associated with integrin tails</i>
ZAP-70	<i>Z-chain (TCR)-associated protein kinase 70kDa</i>

AVANT-PROPOS

La recherche dans le domaine de l'immunologie antitumorale a permis ces dernières années de mettre en évidence le processus d'immunosurveillance anticancéreuse. Toutefois, l'induction d'une réponse immunitaire spontanée contre la tumeur ne résulte pas, le plus souvent, à l'élimination des cellules malignes. De plus, malgré les nombreux efforts consacrés à optimiser les différentes approches d'immunothérapie antitumorales, la réponse cytotoxique spécifique de la tumeur demeure inefficace pour un grand nombre de cancers. Le développement de nouvelles approches d'immunothérapie nécessite une meilleure compréhension des mécanismes permettant l'induction d'une réponse immunitaire plus efficace et durable. De nombreux travaux ont mis en évidence différentes stratégies utilisées par la tumeur pour interférer ou échapper à la réponse immunitaire. Parmi ces stratégies, l'acquisition d'une résistance à la lyse, induite par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), en échappant à la reconnaissance et/ou aux fonctions effectrices des cellules immunitaires. Néanmoins, les CTL sont capables, dans des conditions particulières, de s'adapter au microenvironnement tumoral et ainsi de contourner certaines des voies d'échappement utilisées par les cellules cancéreuses. Malheureusement, les mécanismes d'adaptation des cellules immunitaires au site tumoral restent encore très peu décrits à ce jour. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'axe principal de mon projet de thèse qui vise à analyser un des mécanismes d'adaptation des lymphocytes T CD8⁺ au microenvironnement tumoral dans un modèle de carcinome bronchique non à petites cellules (CBNPC).

L'objectif de cette étude est de comprendre le rôle de l'intégrine CD103 dans la sensibilité des cellules tumorales à la lyse induite par les CTL. La première partie de ce mémoire comporte une synthèse des connaissances actuelles sur les principaux acteurs de la réponse immunitaire antitumorale et des mécanismes d'échappement tumoral au système immunitaire. Je présenterai ensuite les intégrines, en particulier l'intégrine CD103 et son rôle dans l'optimisation de la réponse CTL antitumorale. Dans une seconde partie, je présenterai l'ensemble des résultats, puis je les discuterai.

INTRODUCTION

Chapitre I

I. MISE EN PLACE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE

Face à des organismes pathogènes, notre corps est souvent amené à se défendre en les combattants grâce à un système de défense nommé l'immunité. L'immunité regroupe un ensemble d'acteurs tels que des molécules, des cellules et des tissus qui interagissent en synergie pour mettre en place ce système de défense. Il existe deux mécanismes de défense de l'hôte : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée ou naturelle est la première ligne de protection qui répond rapidement aux infections microbiennes, virales et aux cellules anormales, en particulier les cellules tumorales. Elle se compose d'un ensemble de barrières physiques et chimiques ainsi que d'acteurs cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles et les cellules tueuses naturelles (NK, Natural Killer). Ces cellules sont capables d'intercepter les microorganismes étrangers au soi et les éliminer grâce à l'expression de récepteurs de type PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) qui interagissent avec des ligands présents sur les pathogènes appelés PAMP (*Pathogen-Associated Molecules Patterns*). Les signaux émis par ces récepteurs déclenchent la réponse innée et activent ensuite la deuxième ligne de défense, la réponse adaptative. De plus, les cellules dendritiques (CD), qui expriment les récepteurs PAMP, jouent un rôle de sentinelle entre la réponse innée et adaptative. Dans ce manuscrit, je m'attarderai volontairement sur la réponse adaptative antitumorale et ses différents acteurs.

1. L'immunité adaptative

L'immunité adaptative, appelée communément immunité spécifique, est la deuxième barrière du système immunitaire qui permet de détruire spécifiquement toute cellule nouvellement infectée et toutes cellules transformées. Elle est assurée par les lymphocytes qui dérivent des cellules souches de la moelle osseuse et qui mûrissent soit dans le thymus en ce qui concerne les lymphocytes T (LT), et dans la moelle osseuse en ce qui concerne les lymphocytes B (LB). Les LB et les LT correspondent à la première barrière de l'immunité adaptative, ils sont capables de reconnaître spécifiquement les antigènes (Ag) ce grâce à l'expression respectivement du BCR (*B Cell Receptor*) et du TCR (*T Cell Receptor*). Une fois l'Ag reconnu, une expansion clonale, à lieu ce qui permet un meilleur ciblage du pathogène et une réponse immunitaire plus efficace. L'immunité adaptative joue également un rôle important dans la sécrétion de cytokines qui sont primordiales pour l'activation des cellules de l'immunité innée et adaptative. De plus, les cytokines activent des cellules mémoires qui peuvent être réactivées au moment de la réinfection par le même pathogène.

1.1. Les effecteurs cellulaires de l'immunité adaptative

1.1.1. Les cellules dendritiques

Les DC sont des sentinelles de la réponse immunitaire car elles interagissent avec l'ensemble des signaux émis dans le microenvironnement soit par les agents de l'immunité naturelle soit par les agents de l'immunité acquise dans l'ensemble des tissus périphériques tels que la peau et les muqueuses. Ces cellules jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire grâce à leur fonction de cellules présentatrices d'Ag (APC). Elles sont capables d'assurer des processus de phagocytose, endocytose ou encore de macropinocytose vis-à-vis des pathogènes, sous forme cellulaire ou microbien, et les présenter à leur surface grâce aux molécules du CMH-I (Complexe majeur d'histocompatibilité) ou de CMH-II (système HLA chez l'homme et H-2 chez la souris) pour activer la réponse spécifique adaptative. En effet, les LT sont incapables de reconnaître les Ag sous leur forme native, mais uniquement lorsqu'ils sont apprêtés et présentés par les molécules du CMH à la surface des APC. Les DC sont importantes dans l'activation des différents acteurs lymphocytaires engagés dans la réponse immunitaire antitumorale. De plus, les DC reconnaissent les PAMP et répondent aux signaux émis par les facteurs de la réponse innée, tels que le TNF- α et le CD40-L, ce qui induit une activation et une maturation des DC et une meilleure induction de la réponse adaptative. Les DC peuvent être classées en deux groupes : 1) les DC myéloïdes (DCm) CD34⁺ se développent à partir de progéniteurs myéloïdes et incluent les cellules de Langerhans et les DC interstitielles qui migrent dans les ganglions lymphatiques suite à leur activation (Banchereau, Paczesny et al. 2003). 2) les DC plasmacytoïdes (DCp) dérivent de progéniteurs lymphoïdes (Arpinati, Chirumbolo et al. 2003). Cette classification est fondée sur les types de réponses immunitaires qu'elles initient et l'expression de marqueurs de surfaces.

1.1.2. Les lymphocytes T

Les LT sont des acteurs majeurs de la réponse adaptative qui jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires telle que l'élimination des cellules infectées et des cellules malignes. Les cellules T se divisent en deux sous-populations caractérisées par l'expression des molécules de surface CD4 ou CD8, exerçant des fonctions distinctes. Les LT auxiliaires (Th « *helper* »), sont des lymphocytes T CD4⁺, ayant un rôle important dans la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines. Les LT CD8⁺ ont une activité cytotoxique

et sont responsables de la destruction des cellules infectées par des virus ou des pathogènes intracellulaires une fois activés en CTL.

1.1.2.1. Les lymphocytes T CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ sont essentielles dans la régulation de la réponse immunitaire. Ces cellules incluent les cellules Treg, qui modulent l'activité immunitaire en inhibant les lymphocytes T effecteurs ainsi que d'autres acteurs du système immunitaire. La différenciation et l'activation des cellules *helper 1* (Th1), *helper 2* (Th2) ou *helper 17* (Th17) se fait à partir des cellules T CD4⁺ (Th0) en fonction du type d'Ag présent dans le microenvironnement (Duncan and Swain 1994) et des cytokines secrétées par les acteurs de la réponse immunitaire (Abbas, Murphy et al. 1996). Les cellules Th1 se différencient suite à l'interaction du TCR avec le complexe peptide/CMH et un deuxième signal de costimulation (Palmer and van Seventer 1997) ainsi que des cytokines et les interleukines (IL) comme l'IL-2, l'IL-12, l'IFN- γ et TNF- α qui jouent un rôle important dans leur différenciation. Ces cytokines et ces IL peuvent être produites par les cellules de l'immunité innée et des cellules T CD8⁺ activées. Les IL-4, IL-5 et IL-10 conduisent à une différenciation des Th0 en Th2 (Macatonia, Hosken et al. 1995 ; Bettelli, Carrier et al. 2006 ; Luckheeram, Zhou et al. 2012).

La différenciation de cellules Th1 est induite par la présence d'un agent pathogène intracellulaire ou de cellules malignes. Cette différenciation conduit d'une part à l'activation des macrophages afin de faciliter l'élimination des pathogènes par phagocytose et d'autre part afin de soutenir les LB et les LT CD8⁺ cytotoxiques entraînant respectivement la production d'Ac et l'élimination de cellules infectées. Les cellules Th2 sont impliquées dans la réponse aux pathogènes extracellulaires tels que les parasites, certaines maladies allergiques et l'asthme grâce à une réponse humorale en favorisant la prolifération des mastocytes, mais également la croissance et la différenciation des éosinophiles. De plus, elles favorisent la production d'Ac par les LB et l'activation ou l'inhibition de certaines cellules de l'immunité innée grâce à la sécrétion de cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 (Mosmann and Coffman 1989). Par ailleurs, les infections bactériennes, les champignons extracellulaires activent une réponse Th17 en favorisant le recrutement neutrophilaire. En plus, les Th17 sont impliquées dans les maladies auto-immunes. Cette différenciation est conduite à l'aide des cytokines IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-23 (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al. 2007; Zeng 2014). Les cellules Th17 ont un rôle essentiel dans l'inflammation, l'auto-immunité et les cancers.

Ils se caractérisent par sa sécrétion de cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL21 et l'IL-22.

Différentes études ont montré que les LT CD4⁺ ont un rôle dans la réponse immune antitumorale dans des modèles tumoraux exprimant les molécules de CMH-II (Hock, Dorsch et al. 1991 ; Hung, Hayashi et al. 1998). La contribution des LT CD4⁺ dans la réponse immune antitumorale est assurée grâce à la sécrétion de cytokines dans le microenvironnement tumoral. Cette sécrétion peut avoir un effet chimio-attractant sur les cellules de l'immunité innée comme les cellules NK (Greenberg 1991; Hung, Hayashi et al. 1998), une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés (Williamson, Carswell et al. 1983) (Fransen, Van der Heyden et al. 1986), une hausse de l'expression du CMH-I induisant une meilleure reconnaissance du pathogène par les CTL et son élimination (Dighe, Richards et al. 1994), ainsi qu'une diminution de la néo-angiogenèse tumorale (Coughlin, Salhany et al. 1998; Qin and Blankenstein 2000). Les LTreg, qui se caractérisent par l'expression du CD25, du CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4*) et du GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) et le facteur de transcription Foxp3, jouent un rôle important dans la réponse immunitaire antitumorale (Chaput, Darrasse-Jeze et al. 2007).

1.1.2.2. Les lymphocytes T CD8⁺

Le rôle majeur des LT CD8⁺ est d'éliminer les cellules infectées par des pathogènes et les cellules malignes. L'activation des cellules CD8⁺ naïves en CTL se fait grâce à deux signaux. Le premier est la liaison du TCR au complexe CMH/peptide présenté par les APC et le second est induit par les molécules de costimulation telles que le CD28 ou encore le CD40. De plus, les APC secrètent de l'IL-12 et afin de différencier les Th0 en Th1, ces derniers participent à la stimulation des CTL CD8⁺ par la sécrétion de cytokines tel que l'interféron-alpha (IFN- α) qui leur permettent de se lier aux APC afin d'être activés (Athie-Morales, Smits et al. 2004 ; Huang, Hao et al. 2007). Cette activation induit l'augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices et la sécrétion des cytokines qui sont nécessaires pour leur activation (Wiesel and Oxenius 2012). Un CTL activé circule dans le corps jusqu'à ce qu'il reconnaisse une cellule cible spécifique grâce à son TCR. Des LT CD8⁺ spécifiques de Ag tumorale ont été identifiées dans les PBL (*Peripheral blood lymphocyte*) de patients atteints de cancers en particulier dans le mélanome (Ferrini, Biassoni et al. 1985 ; Belldegrun, Muul et

al. 1988; Itoh, Platsoucas et al. 1988). Ces cellules jouent un rôle important dans la régression spontanée des tumeurs (Mackensen, Carcelain et al. 1994). Il a été montré, dans des études vaccinales chez la souris, que l'induction d'une réponse antitumorale est liée à la présence de LT CD8⁺ (Zatloukal, Schneeberger et al. 1995 ; Porgador, Snyder et al. 1996; Xu, Clarke et al. 2000 ; Srivastava 2002). De même chez l'homme, il a été observé lors de la vaccination de patients par le peptide MAGE-3, une infiltration de LT qui conduit à une régression des lésions tumorales (Thurner, Haendle et al. 1999). L'ensemble de ces études valide l'importance des LT CD8⁺ cytotoxiques dans la réponse immunitaire antitumorale.

2. Rôle des LT CD8⁺ dans la réponse immunitaire spécifique

L'initiation d'une réponse immunitaire spécifique est le résultat d'un mécanisme complexe qui fait intervenir plusieurs acteurs du système immunitaire tels que les DC, les macrophages et les lymphocytes T. Les cellules T CD8⁺ sont des acteurs clefs de la réponse immunitaire contre les différents pathogènes. Une fois activées par les DC au niveau des ganglions lymphatiques, ces cellules spécifiques de l'Ag vont se différencier en cellules cytotoxiques capables de détruire les cellules cibles.

2.1. Différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en effecteurs cytotoxiques

L'activation et la maturation des LT CD8⁺ sont fondées sur leur capacité à se différencier (Kaech, Hemby et al. 2002) en différentes sous-populations cellulaires, se caractérisant par des phénotypes particuliers et des fonctions bien définies. Ces cellules se caractérisent par l'expression de différents récepteurs de surface comme CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27 et CD28 ou d'agents cytotoxiques tels que l'IFN- γ , le TNF- α , Fas-L, les granzyme A et B ou la perforine (Sallusto, Lenig et al. 1999; Takata and Takiguchi 2006; Romero, Zippelius et al. 2007) (**Fig. 1**).

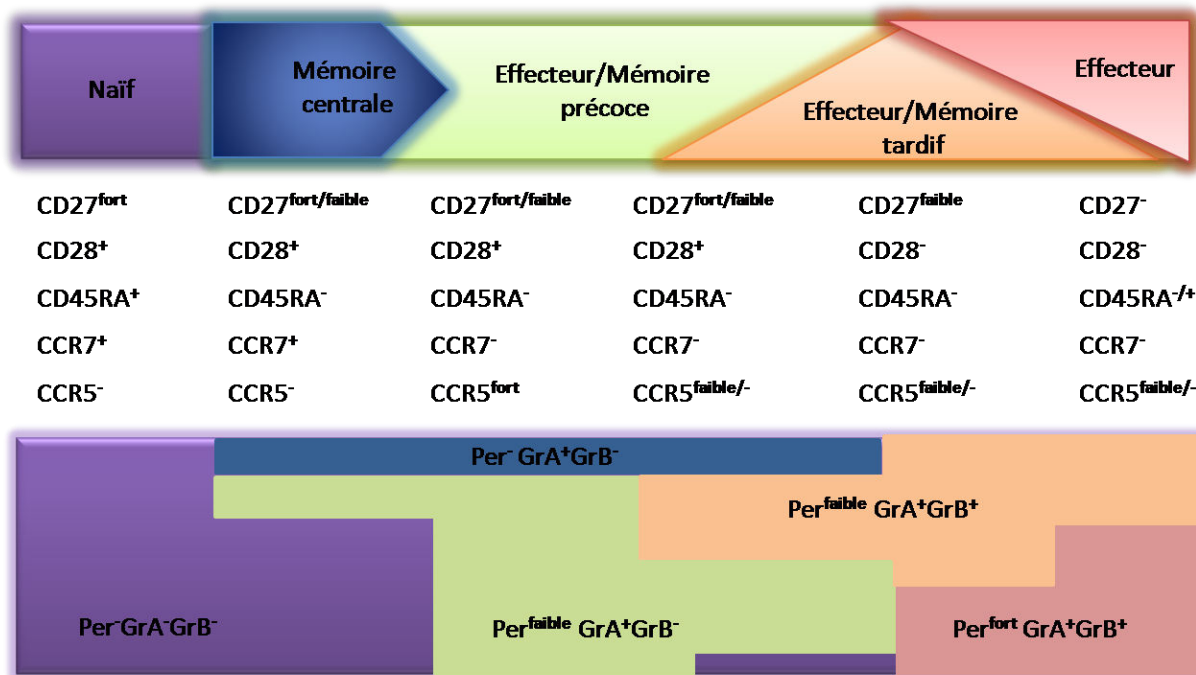


Figure 1. Différenciation des cellules T CD8⁺. Les LT CD8⁺ passent par différents stades d'activation et de différenciation qui sont accompagnés par l'expression de nombreuses molécules membranaires comme CD45RA, CD27 et CD28, de molécules cytotoxiques, telles que les granzymes A et B et la perforine et de récepteurs de chimiokines comme CCR7 et CCR5 (d'après (Takata and Takiguchi 2006)).

La différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (CD45RA⁺/CCR7⁺/CD27⁺/CD28⁺) en cellules effectrices (CD45RA⁺/CCR7⁻/CD27⁻/CD28⁻) se traduit, d'une part, par l'expression de molécules cytotoxiques (en particulier le granzyme B et la perforine) conférant à la cellule ses pouvoirs lytiques, et d'autre part, par la perte du potentiel de domiciliation ou « homing » au niveau des ganglions lymphatiques. Les lymphocytes T CD8⁺ naïfs se caractérisent phénotypiquement par la régulation négative de l'expression de CCR7 et de CD62L (L-selectine) (Sallusto, Lenig et al. 1999) et par l'expression de récepteurs membranaires tels que CD44 (un récepteur de l'acide hyaluronique), les intégrines β_1 et β_2 et les récepteurs des chimiokines comme CCR5 et CCR2 (Baron, Madri et al. 1993; Kaeck, Hemby et al. 2002; Fanning, Volkov et al. 2005). Dans le cas où ces cellules se retrouvent dans les sites inflammatoires, elles ne pourront plus repartir dans les ganglions lymphatiques et vont se caractériser par l'expression de récepteurs de LT effecteurs comme les molécules d'activation CD43 et CD69 et KLRG1 (*killer cell lectin-like receptor, récepteur des cadhérines*). La molécule KLRG1 est un récepteur de contrôle de la réponse immunitaire afin d'empêcher toute inflammation inutile qui peut provoquer des dégâts irréversibles pour l'organisme (Arens and Schoenberger 2010). L'activation des LT CD8⁺ naïfs en cellules effectrices

nécessite d'une part, la présence de signaux dans le microenvironnement telles que les cytokines inflammatoires (IL-12 ou l'IFN- α/β) et d'autre part, une forte présentation de l'Ag par les APC (Parish and Kaech 2009). Par opposition les cellules mémoires ont besoin juste d'un contact avec l'Ag pour être réactivées (Ahmed and Gray 1996; Williams and Bevan 2007).

Lors du premier contact avec l'Ag, les cellules T spécifiques vont proliférer et se différencier en LT effecteurs afin de neutraliser le pathogène. Une fois le pathogène lysé, une grande partie des LT CD8⁺ activés rentrent en apoptose afin d'être éliminés et d'éviter une réponse auto-immune (Butz and Bevan 1998; Murali-Krishna, Altman et al. 1998). A la fin de cette phase, une petite population de LT CD8⁺ survit à l'apoptose et acquiert un phénotype mémoire. Elle reste à long terme dans l'organisme et elle peut éliminer rapidement et efficacement tout pathogène déjà rencontré. Cette population mémoire est capable de sécréter des cytokines pro-inflammatoires permettant une élimination rapide, en quelques heures, des cellules malignes, contrairement aux cellules T CD8⁺ naïves qui ont besoin d'un laps de temps plus long (7 à 8 jours) afin d'avoir la même capacité fonctionnelle effectrice (Arens and Schoenberger 2010; DiSpirito and Shen 2010). L'expression des récepteurs à l'IL-15 et l'IL-7 (CD127) à la surface des LT mémoires, leur permet de survivre plus longtemps et d'avoir la capacité d'auto-renouvellement. Afin de distinguer les LT effecteurs/mémoires des lymphocytes effecteurs, la chaîne α du récepteur IL-7 a été proposée comme marqueur de différenciation (Bachmann, Wolint et al. 2005).

En se basant sur l'expression des récepteurs CD62L et CCR7, il existe deux sous-populations majeures de LT mémoires : **1)** Les cellules T effectrices mémoires (ou T_{EM}) de phénotype CD45RA⁻/CD62L⁻/CCR7⁻ se trouvent essentiellement dans les tissus périphériques (Fick, Barker et al. 1995). **2)** Les cellules centrales mémoires (ou T_{CM}) de phénotype CD45RA⁻/CD62L⁺/CCR7⁺ se localisent dans les organes lymphoïdes secondaires (Sallusto, Lenig et al. 1999). Au vue de leur localisation anatomique bien distincte, cela leur confère des fonctions bien distinctes. En effet, les T_{EM} ont la capacité d'acquérir les fonctions effectrices (Wakim, Waithman et al. 2008) en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- γ , et des granules cytotoxiques, rapidement après leur activation. Par opposition, les T_{CM} ne peuvent pas acquérir des fonctions effectrices, mais ont la capacité de proliférer rapidement (Wolint, Betts et al. 2004). Il existe aussi une sous-population T_{EM} appelés «cellules T mémoires résidant dans les tissus» (Cellules T_{RM}). Ces T_{RM} sont caractérisés par l'expression l'intégrine

$\alpha_E\beta_7$ et du marqueur d'activation CD69 (Gebhardt, Wakim et al. 2009). Les T_{RM} ont été trouvées dans les tissus tels que la peau (Jiang, Clark et al. 2012), les ganglions sensoriels (Wakim, Waithman et al. 2008; Gebhardt, Wakim et al. 2009), le cerveau (Wakim, Woodward-Davis et al. 2010), l'intestin (Masopust, Choo et al. 2010), les poumons (Piet, de Bree et al. 2011; Purwar, Campbell et al. 2011; Teijaro, Turner et al. 2011) et les amygdales (Woodberry, Suscovich et al. 2005; Hofmann and Pircher 2011). Ils sont retenus au niveau du site de l'infection primaire pendant de longues périodes après la rémission de la maladie, même en l'absence complète de l'Ag (Mackay, Stock et al. 2012). De plus, ils jouent un rôle pivot pour conférer une immunité locale contre une nouvelle exposition au même pathogène (Gebhardt, Wakim et al. 2009).

2.2. La phase effectrice de la réponse immunitaire spécifique

Le développement d'une réponse immunitaire spécifique efficace résulte de l'activation des LT par les APC suite à une interaction physique entre les deux cellules. Le nombre de contact physique entre les LT et des APC est faible car le nombre de LT naïfs est vraiment bas, avec un rapport de 1 LT pour 10^5 - 10^6 APC, et la localisation anatomique est différente pour les deux populations (Blattman, Antia et al. 2002). En effet, les organes lymphoïdes secondaires sont des organes importants pour la rencontre des APC avec les LT naïfs provenant du sang. Les LT naïfs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'interagir avec les DC grâce à la reconnaissance par le TCR du complexe peptide-CMH-I spécifique présenté par les DC. Cette interaction permet l'activation et la prolifération des cellules naïves puis leur différenciation en cellules effectrices. Ces dernières acquièrent alors la capacité de détruire les cellules infectées ou les cellules malignes (Masson, Mount et al. 2008).

2.2.1. Circulation et activation des lymphocytes T $CD8^+$

La différenciation et l'activation des LT $CD8^+$ se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires et des vaisseaux lymphatiques liant les différents tissus aux vaisseaux sanguins. Il a été montré que les LT $CD8^+$ naïfs entrent dans la circulation sanguine par un mécanisme impliquant des molécules d'adhérence, comme les sélectines, les intégrines, et des chimiokines (Cyster 2005; Asperti-Boursin, Real et al. 2007). De plus, les LT $CD8^+$ circulants interagissent avec les DC présentant l'Ag au niveau des veinules à endothélium élevé (HEV, *High endothelial venules*). Ces HEV expriment des molécules, qui ont un rôle dans le *homing*, comme les adressines (des ligands de la L-sélectine CD62L), ainsi que des molécules

chimioattractantes, comme CCL21 (ligand de CCR7). Les LT CD8⁺ CCR7⁺/CD62L⁺ vont ensuite exprimer les intégrines $\alpha_1\beta_4$ et $\alpha_4\beta_7$ qui interagissent avec leurs ligands respectifs VCAM1 et MadCAM-1 exprimés sur les parois endothéliales pour enclencher le mécanisme de *rolling*. Ces lymphocytes expriment l'intégrine $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1 : *leukocyte function associated antigen-1*, CD11A/CD18) qui interagit avec ses ligands ICAM-1 et 2 (*Intercellular adhesion molecule*) exprimés sur les parois endothéliales afin d'arrêter et de stabiliser les lymphocytes sur la paroi. En absence de pathogènes ou de réponse inflammatoire, les cellules T vont rejoindre des DC véhiculées par les vaisseaux lymphatiques afférents n'ayant pas d'Ag. Ces cellules vont alors repartir du ganglion via les vaisseaux lymphatiques efférents et se retrouver de nouveau dans la circulation sanguine pour migrer vers d'autres tissus lymphoïdes secondaires. Lors de la sortie des LT CD8⁺ des ganglions par les vaisseaux lymphatiques afférents, ils expriment un récepteur S1PR1 qui permet de reconnaître et de suivre un gradient de concentration du lipide S1P (*Sphingosine-1-phosphate*). En effet, la concentration du S1P est plus élevée dans la lymphe et dans le sang que dans les tissus, par conséquent sa reconnaissance via son récepteur exprimé par le lymphocyte provoque le retour de ce dernier dans la circulation sanguine (Ley and Kansas 2004 ; Schwab SR 2005). De plus, S1P1 est impliqué dans la rétention des Trm en régulant leur capacité à sortir des tissus non-lymphoïdes (Cauley and Lefrancois 2013).

2.2.2. La reconnaissance antigénique

Lors d'une réponse immunitaire contre un pathogène, les LT CD8⁺ entrent dans les ganglions lymphatiques afin d'être activés au contact des DC présentant l'Ag spécifique. Dans un premier temps, les LT vont sonder la surface des DC grâce à des liaisons de faibles affinités et transitoires (pendant 8-10h) assurées par l'expression de la molécule d'adhérence, telle que ICAM-3 et la famille CD2 exprimé par le LT CD8⁺, la famille de lectines de type C exprimées par les DC. Il a été estimé qu'une DC peut interagir avec 5000 lymphocytes T en une heure tout en ayant la capacité d'engager, simultanément, jusqu'à 10 lymphocytes T (Bousso and Robey 2003 ; Mempel 2003). A ce taux, les chances pour qu'une DC rencontre en une journée entre 100 et 1000 lymphocytes T spécifiques d'un Ag donné sont excellentes. Puis le lymphocyte forme une liaison stable avec la DC présentant l'Ag (8h-20h). Une fois la liaison entre LT CD8⁺ et les DC est stabilisée, les cellules T vont exprimer le récepteur à l'IL-2 (CD25) qui va induire *in fine* la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- γ . Enfin, les LT CD8⁺ vont rentrer en expansion clonale et quitter les ganglions lymphatiques, environ 20h

après être entrés, suite à leur activation et au détachement des DC (Mempel TR 2004). Grâce à la technique de microscopie à balayage laser à deux photons (TPLSM, *two-photon laser scanning microscopy*), le comportement des cellules T *in vivo* a été étudié. Il a été montré que les cellules T naïves sont en perpétuel mouvement et qu'elles explorent à grande vitesse les ganglions lymphatiques (à la vitesse de 10-15 $\mu\text{m}/\text{min}$ en moyenne, et 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ à très haute vitesse), à la recherche d'Ag et de signaux de dangers et ont la capacité d'interagir avec 5000 DC en 1 heure (Miller MJ 2002 ; Miller MJ 2003).

2.2.3. Mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺

La réponse immunitaire adaptative a un rôle primordial dans la lyse des cellules cibles *via* les LT CD8⁺ cytotoxiques qui sont les principaux acteurs de cette réponse (Paul 1994). Par ailleurs, les DC sont importants dans l'activation des CTL CD8⁺ par la présentation du complexe peptide-CMH-I qui est reconnu spécifiquement par le TCR. Le TCR est la molécule clef du mécanisme d'activation des LT. Il est relocalisé dans une structure multimoléculaire concentrique au niveau de la région de contact entre le LT et le DC, appelé « synapse immunologique » (SI) (Dustin 2002). Le point de contact entre le CTL et sa cible, appelée la SI cytotoxique, ou encore synapse sécrétoire, comprend une zone dite de sécrétion se trouvant à côté de la zone d'interaction TCR/pCMH (**Fig. 2**). Après l'engagement du TCR, de nombreux changements au niveau du cytosquelette d'actine qui induisent la relocalisation du centre organisateur des microtubules (MTOC) vers le site d'interaction entre le CTL et sa cible (Kuhn and Poenie 2002). L'accumulation du calcium intracellulaire induit par la relocalisation du MTOC permet la polarisation des granules cytotoxiques au niveau de la SI (Lyubchenko, Wurth et al. 2001) (Beal, Anikeeva et al. 2009).

Initialement, les granules sont localisés derrière le MTOC avant de le contourner, pour aller au niveau du site de contact plus particulièrement au niveau de la cSMAC. La cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) est une zone située entre les deux membranes cellulaires, caractérisée par la taille des molécules engagées et rassemble les complexes TCR/peptide/CMH-I, les molécules de signalisation tel que l'adaptateur LAT (*linker of activation of T cell*), les protéines tyrosines kinases (PTK) FYN et LCK (*lymphocyte specific protein tyrosine kinase*), ZAP-70 (*z-chain (TCR)-associated protein kinase 70kDa*), la PKC- θ (*Protein Kinase- θ*) et la phospholipase C- γ (PLC- γ), en plus des molécules de costimulation comme CD28, CD2/LFA-2 et leurs ligands respectifs CD80 ou CD86, et CD48/CD58 (Huppa and Davis 2003). Autour de la cSMAC se trouve la pSMAC (*peripheral SMAC*) qui regroupe

les molécules d'adhérences comme l'intégrine LFA-1 et son ligand ICAM-1 ainsi que des protéines adaptatrices du cytosquelette telles que la Taline et l'Ezrine (Das V 2002) (Monks CR 1998). La dSMAC (*distal* SMAC) est située en dehors de la zone de contact où se regroupe des protéines à haut poids moléculaire telle que les tyrosines phosphatase CD45 et CD43 (Allenspach EJ 2001; Delon J 2001; Freiberg, Kupfer et al. 2002).

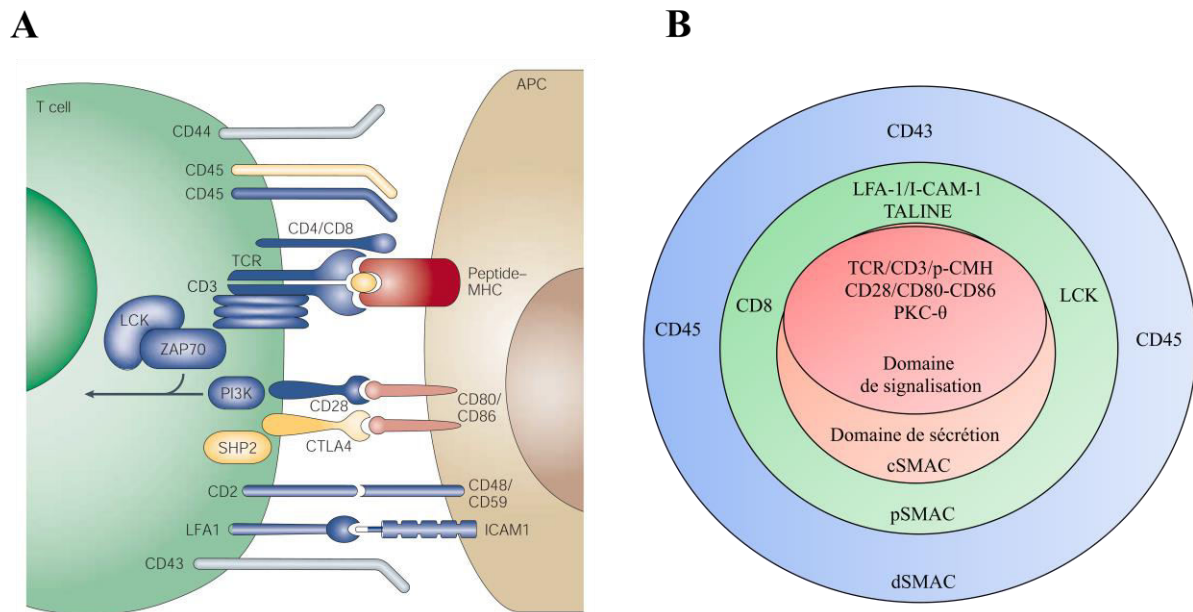


Figure 2. Structure de la synapse immunologique concentrique. (A) Une vue transversale de liaison entre un LT et une CPA montrant les différents couples ligands/récepteurs et molécules engagées dans la signalisation. (B) Une vision schématisée de la SI mature permettant de différencier le domaine central cSMAC, le domaine périphérique pSMAC et le domaine distal dSMAC. La cSMAC rassemble les molécules de signalisation (TCR-CD3/pCMH) et de costimulation (CD28/CD80- CD86), et elle a la propriété d'être scindée en deux régions distinctes au niveau d'un CTL : le domaine de signalisation et le domaine sécrétoire. Les molécules d'adhérence (LFA-1/ICAM-1) se regroupent dans la pSMAC, en revanche les protéines de hauts poids moléculaires (CD43 ou encore la P-sélectine) sont localisées dans le dSMAC (d'après ((Huppa and Davis 2003))).

La SI est importante dans l'activation des LT naïfs par la DC, mais également dans l'induction de la lyse des cellules cibles, par exocytose des granules cytotoxiques (Berke 1995; Pipkin and Lieberman 2007). Toutefois, elle est impliquée aussi dans la modulation de l'activité cytotoxique des LT par la sécrétion de cytokines et de chimiokines.

2.3. Les voies de lyse

Suite à l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH induisant la différenciation des CTL. Ces derniers quittent les ganglions lymphatiques *via* les vaisseaux efférents pour aller vers tous les sites de l'inflammation. Cette migration est assurée grâce aux molécules chimio-attractantes, telles que CXCL12 (via son récepteur CXCR4) et CCL2 (via le récepteur CCR4) produit par les cellules de la réponse immunitaire innée déjà présentes sur le site de l'inflammation (Homey, Muller et al. 2002 ; Zhang and Fang 2005 ; Brown, Vishwanath et al. 2007). Ces lymphocytes infiltrants la tumeur (TIL) se déplacent au sein même de la tumeur à la recherche éventuelle de cibles tumorales. Le ciblage rapide des cellules tumorales est rendu possible grâce aux molécules d'adhésion (Jaaskelainen, Maenpaa et al. 1992). Une fois l'Ag spécifique reconnu, les TIL arrêtent leur migration pour former une interaction stable similaire à celle réalisée entre un lymphocyte et une APC. Après l'interaction avec leur cible, les CTL reprennent leur migration à la recherche de nouvelles cibles (Breart, Lemaitre et al. 2008). Les LT cytotoxiques activés sont directement impliqués dans la destruction spécifique des cellules endommagées ou des cellules malignes. Les CTL utilisent plusieurs mécanismes pour éliminer les cellules cibles. Il existe deux voies essentielles: la voie perforine/granzyme et les voies des récepteurs à domaine de mort, dont la plus étudiée est la voie Fas/Fas-L.

2.3.1. La voie perforine/granzyme

Les granules cytotoxiques rassemblent les protéines essentielles à la destruction des cellules cibles. Ce sont des vésicules sécrétoires, qui contiennent, en plus des molécules habituellement présentes dans les lysosomes comme LAMP-1 (« *lysosome associated membrane protein 1* », CD107a), LAMP-2 (CD107) ou encore LAMP-3 (CD63), des protéines impliquées dans la mort par apoptose telles que des protéoglycanes, la perforine, ou encore des sérine-protéases de la famille des granzymes (Blott and Griffiths 2002; Pipkin and Lieberman 2007). Ces protéines sont gardées sous forme active, mais les conditions à l'intérieur des granules les empêchent de fonctionner avant leur libération. Chez l'homme, les sérine-protéases regroupent les 5 membres de la famille des granzyme (A, B, H, M et K), dont les plus abondantes sont les granzyme-A et les granzyme-B. Ces Gr sont initialement synthétisés sous la forme de pro-enzymes qui sont par la suite activées par clivage protéolytique induit par la Cathepsine C, elle aussi présente au niveau des granules. La perforine est une protéoglycane présentant une analogie de structure avec la protéine C9 du complément. La perforine est caractérisée par sa capacité à former des pores par multimérisation dans la membrane cellulaire de manière dépendante du calcium (Tschopp,

Masson et al. 1986), et permettre ainsi l'internalisation des autres constituants des granules cytotoxiques. Enfin, les granules cytotoxiques contiennent des protéines, telles que la calréticuline et les protéoglycanes, permettant de protéger les CTL contre l'action de leurs propres granules (Dupuis, Schaerer et al. 1993 ; Andrin, Pinkoski et al. 1998 ; Fraser, Michalak et al. 1998 ; Fraser, Karimi et al. 2000)

Lors de l'activation des CTL, le MTOC, l'appareil de Golgi et les granules cytotoxiques se déplacent vers la zone de contact membranaire entre la cellule cytotoxique et la cellule cible. Les microtubules du MTOC transportent des granules cytotoxiques, contenant des molécules lytiques tels que la perforine et le granzyme, vers le site de sécrétion au niveau de la SI et plus particulièrement au niveau de la cSMAC (Faroudi, Utzny et al. 2003 ; Wiedemann, Depoil et al. 2006). Une fois les granules cytotoxiques polarisés à la SI, ils fusionnent avec la membrane plasmique des CTL au niveau de la zone de contact avec la cellule cible et sont par la suite libérées dans l'espace interstitiel formé par la synapse. Une fois les granules cytotoxiques libérés par les CTL, la perforine va polymériser et s'insérer dans la membrane cellulaire. Cela va former des pores au sein de la membrane plasmique de la cellule cible *via* lesquels le granzyme B y rentre. Une fois libéré dans le cytoplasme, le GrB clive un très grand nombre de substrats et active ainsi les voies d'apoptose dépendante ou non des caspases (Chowdhury and Lieberman 2008). En effet, le GrB induit principalement l'apoptose en clivant la procaspase-3 (Stennicke, Jurgensmeier et al. 1998) ou grâce à la caspase-8 (**Fig. 3**).

Le GrB peut également cliver la protéine Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) (Russell and Ley 2002; Stinchcombe, Majorovits et al. 2006; Afonina, Cullen et al. 2010), ce qui provoque la libération des facteurs proapoptotiques mitochondriaux avec l'action conjointe d'autres membres de la famille Bcl-2, tels que Bax (Thiery, Abouzahr et al. 2005). Leur translocation induit la libération du cytochrome c et l'activation subséquente de la caspase-9, qui active ensuite la caspase-3. Enfin, le GrB peut provoquer l'apoptose indépendamment des caspases en clivant certains substrats communs aux caspases dont ICAD, induisant la libération de l'endonucléase DFF40/CAD qui participe à la mort de la cellule cible par fragmentation de l'ADN (Thomas, Du et al. 2000).

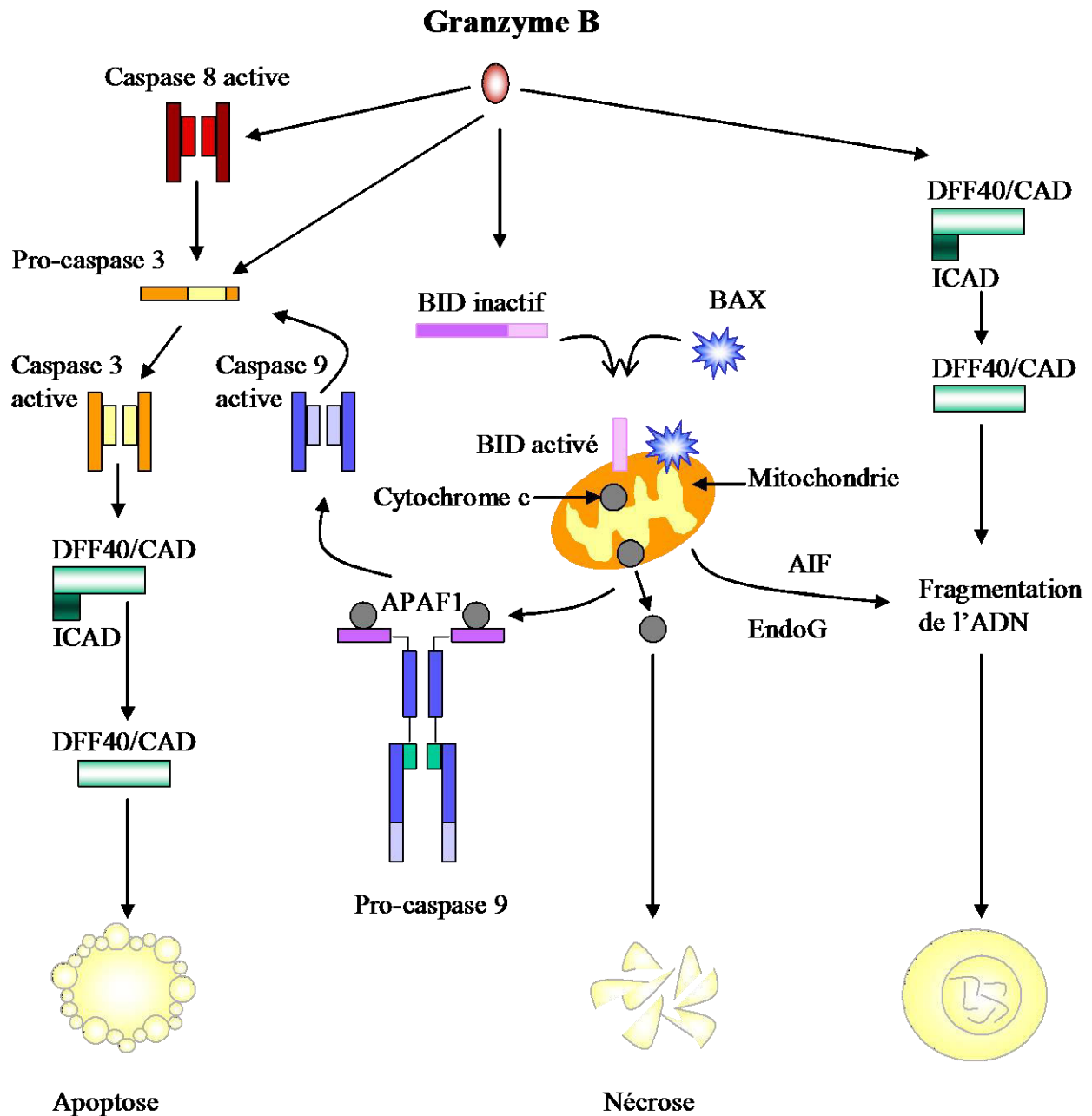


Figure 3. Différentes voies de mort initiées par le Granzyme B. Le Granzyme-B peut induire la mort cellulaire soit par clivage direct de la pro-caspase 3 soit de façon indirecte *via* la caspase 8. De plus, le granzyme-B peut aussi cliver la protéine BID, ce qui induit sa translocation ainsi que celle d'autres membres de la famille Bcl-2, tels que BAX, vers la mitochondrie. En effet, la translocation de ces protéines engendre la libération du Cytochrome c et l'activation de la caspase 9. De même, un mauvais fonctionnement de la mitochondrie peut conduire à une nécrose cellulaire avec le relargage de facteurs comme AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) et l'EndoG (*Endonuclease G*). Enfin, il a été montré aussi que le Granzyme B entraîne la mort de la cellule cible par fragmentation de l'ADN *via* l'activation directe de la molécule DFF40/CAD (*DNA Fragmentation 40/Caspase-Activated Deoxynuclease*).

2.3.2. La voie Fas/Fas-L

La voie Fas/Fas-L est un mécanisme cytotoxique indépendant du flux calcique (Cao, Cai et al. 2007). Cette voie joue un rôle essentiel dans l'élimination des cellules endommagées, infectées ou cancéreuses exprimant Fas. Elle joue un rôle aussi dans l'induction d'un signal apoptotique afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire ou la tolérance. L'expression simultanée de Fas et FasL par les lymphocytes T activés va entraîner leur mort cellulaire par AICD (*Activation-induced cell death*). L'AICD est un mécanisme apoptotique déclenché par les récepteurs à domaine de mort suite à une hyperactivation cellulaire. Elle est impliquée dans le contrôle de l'expansion des cellules T activées, suite à l'engagement du TCR, et permet d'induire une tolérance lymphocytaire (Lenardo, Chan et al. 1999). En effet, une fois le pathogène éliminé, les lymphocytes T activés doivent être éliminés de la circulation par AICD.

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire de type I. Il est exprimé sur de nombreuses cellules normales et tumorales dont les lymphocytes activés. Son ligand est Fas-L (CD95L) qui est une protéine transmembranaire de type II. Ce ligand peut être retrouvé sous forme membranaire, ou soluble résultant du clivage de la forme membranaire par des métalloprotéases (Kayagaki, Kawasaki et al. 1995). Fas-L est exprimé par lymphocytes T activés et les cellules NK (Igney and Krammer 2005).

L'interaction de Fas avec Fas-L induit le recrutement de protéines adaptatrices FADD (*Fas Associated Death Domain*) qui vont se fixer sur la partie C-terminale du domaine de mort Fas (Chinnaiyan and Dixit 1997). FADD possède un domaine N-terminal appelé « domaine effecteur de mort » (*DED, Death Effector Domain*). Ce domaine va recruter la pro-caspase 8 (la forme inactive de la caspase 8) (Boldin, Goncharov et al. 1996). L'ensemble de ces protéines vont former un complexe multiprotéique appelé « complexe de signalisation induisant la mort » ou DISC (*Death Inducing Signaling Complex*). La formation de « clusters » de Fas avec un nombre élevé de pro-caspases 8 au sein du DISC va induire l'activation par leur clivage auto et trans-protéolytique et la libération des formes actives de la caspase 8 dans le cytosol, qui vont à leur tour cliver certaines caspases effectrices comme les caspases 3, 6 et 7. (**Fig. 4**).

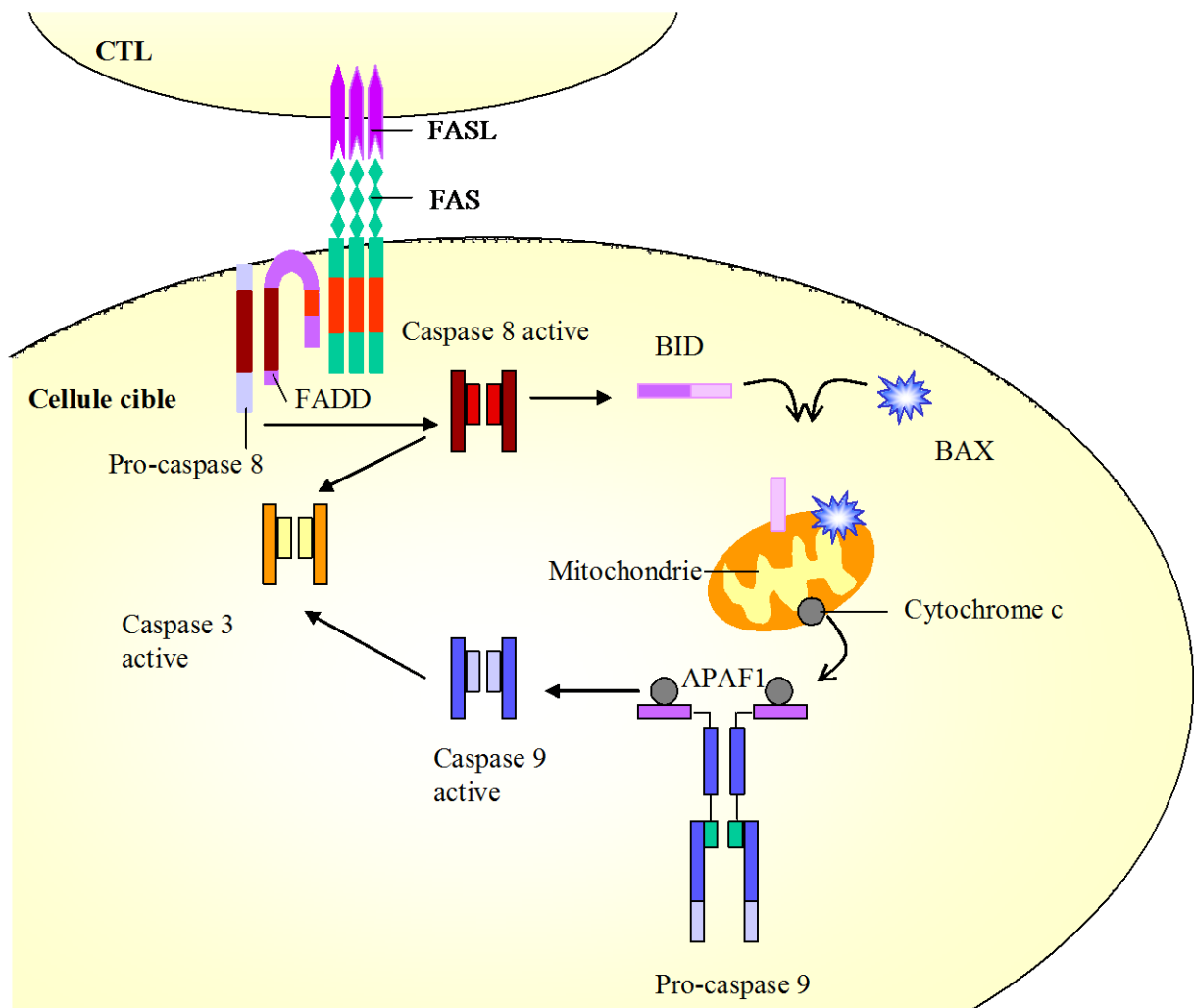


Figure 4. La voie de signalisation Fas/Fas-L. L'activation du récepteur Fas par son ligand Fas-L induit le recrutement de la caspase 8 grâce à son interaction avec la protéine FADD. L'activation de la caspase 8 active soit les autres membres de la famille des caspases (notamment la caspase 3), soit le clivage de BID et BAX, provoquant ainsi leur translocation dans la mitochondrie. Ces derniers provoquent le relargage du cytochrome c, qui induit l'activation de la caspase 9 puis la caspase 3.

Il existe aussi une autre voie apoptotique en aval de Fas qui fait intervenir les protéines de la voie mitochondriale tel que BAX. En fonction de la voie utilisée, deux types de cellules ont pu être définies (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Les cellules de type I utilisent uniquement la voie apoptotique impliquant les caspases. A l'inverse, les cellules de type II seraient dépendantes de l'activité apoptotique des mitochondries. La différence de comportement apoptotique entre les deux types de cellules n'a pas encore été bien définie, mise à part la quantité de pro-caspases 8 recrutée et clivée au niveau du DISC qui est fortement exprimé

dans les cellules de type I. Enfin, il a été prouvé le rôle important de la voie Fas/Fas-L dans le processus de défense du système immunitaire contre les pathogènes, grâce à l'utilisation de souris déficientes pour la perforine (Kagi, Vignaux et al. 1994; van den Broek, Kagi et al. 1996).

3. Mise en place de la réponse immunitaire antitumorale spécifique l'immunosurveillance

L'hypothèse selon laquelle le système immunitaire a un rôle essentiel dans la surveillance antitumorale, a été suggérée par Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909) (Burnet 1957). Puis, l'équipe de Macfarlane Burnet (Burnet 1957 ; Burnet 1971) et Thomas (1959) ont établi les bases de la « théorie de l'immunosurveillance ». En considérant les connaissances récemment acquises en transplantation et en immunité antitumorale, ils proposèrent que les lymphocytes doivent éliminer continuellement les cellules normales nouvellement transformées. A partir des informations acquises en immunité antitumorale, Burnet et Thomas ont émis une théorie selon laquelle le système immunitaire est capable d'anticiper continuellement la formation d'anomalies tumorales (Old and Boyse 1964; Klein 1966; Burnet 1970; Stutman 1974; Thomas 1982). Ensuite, les études de Robert Schreiber ont permis de développer la théorie de Burnet selon laquelle les cellules malignes prolifèrent et échappent à la surveillance de la réponse immunitaire (Dunn, Bruce et al. 2002 ; Dunn, Old et al. 2004).

C'est dans ce contexte que Kupper et Fuhlbrigge ont revu le processus de la surveillance immunitaire par lequel les acteurs de la réponse immunitaire situés au niveau des tissus périphériques reconnaissent et éliminent les agents pathogènes du non soi (Kupper and Fuhlbrigge 2004). Finalement, l'apparition des nouvelles technologies, comme la conception de souris transgéniques et la production d'Ac bloquants, ont clairement validé ce concept et identifié les acteurs importants de la réponse immunitaire antitumorale (Burnet 1970; Thomas 1982; van den Broek, Kagi et al. 1996; Shankaran, Ikeda et al. 2001). Il est maintenant clairement admis que la réponse immunitaire antitumorale, aussi bien innée qu'adaptative, est capable d'identifier les signaux de stress et/ou de dommages engendrés par les cellules malignes et de les éliminer (Swann and Smyth 2007)(**Fig. 5**). Les APC se trouvant dans les tissus périphériques phagocytent les Ag associés aux tumeurs (TAA) puis activent les CTL afin d'éliminer les cellules malignes. Les TAA peuvent être divisés en trois groupes : les Ag du soi, les Ag du soi modifiés et les néo-Ag. Les Ag du soi sont des Ag surexprimés (comme HER-2 (Disis, Calenoff et al. 1994)) ou non dans le tissu d'origine où la tumeur s'est formée

(exemple : NY-ESO-1 (Tureci, Mack et al. 2006)). Les Ag du soi modifiés sont les protéines du soi modifiées et dont la fonction est perdue (exemple : RAS (Abrams, Stanziale et al. 1996)). Les néo-Ag sont les protéines de fusions induites par des mutations ou des réarrangements chromosomiques aberrants (exemple : BCR-ABL (Abrams, Stanziale et al. 1996)). Quelquefois, les cellules transformées échappent à la phagocytose et continuent de proliférer. Par conséquent, l'immunité adaptative doit être déclenchée pour dégrader les cellules tumorales (Vesely, Kershaw et al. 2011).

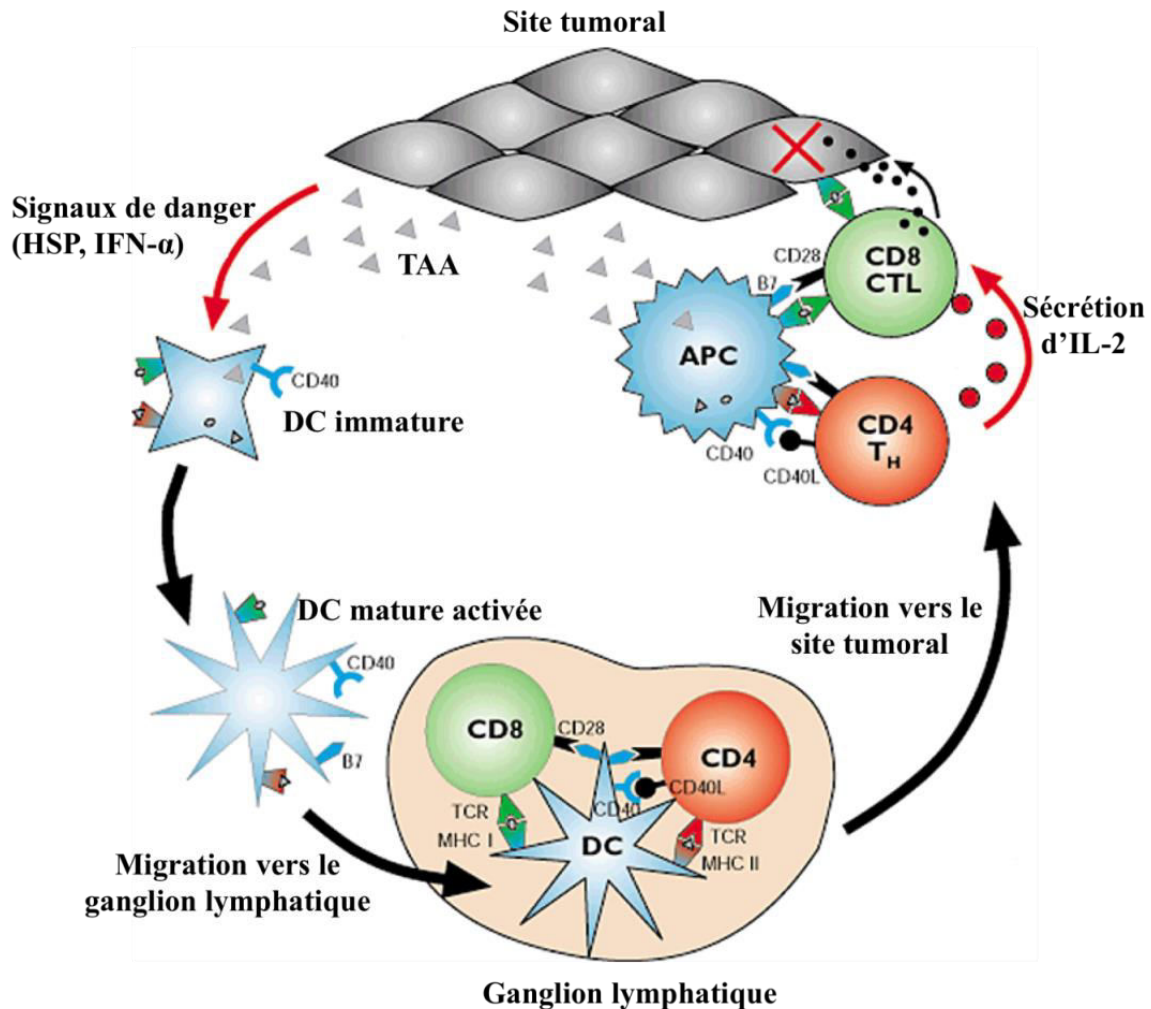
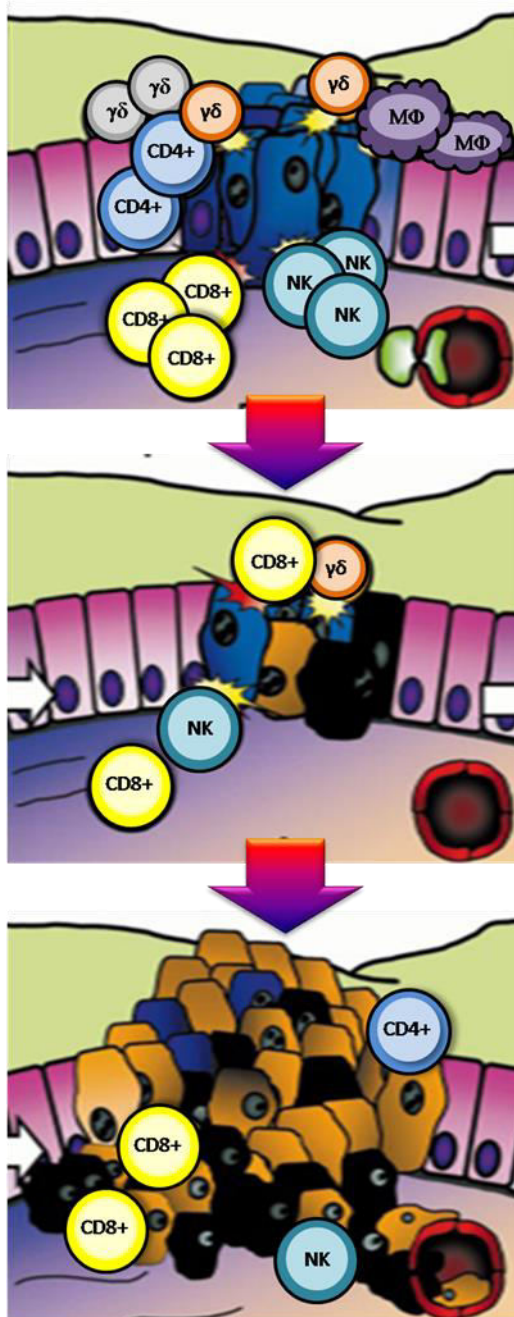


Figure 5. L'immunosurveillance antitumorale. Lorsqu'une tumeur se forme, les TAA vont être libérés dans le milieu tumoral et capturés par les CPA professionnelles telle que les DC immatures. A l'issue de la capture de l'Ag, les DC vont s'activer et se diriger vers les ganglions lymphatiques où ils activeront les LT naïfs par les molécules de costimulation (tel que, B7/CD28). L'activation et la maturation des DC s'accompagnent d'une transformation phénotypique, comme l'expression de récepteurs de chimiokines, CMH II, DC-LAMP (*lysosome-associated membrane protein*). Puis, les DC matures sont alors capables de présenter ces Ag aux lymphocytes T CD4⁺ via le CMH-II et aux LT CD8⁺ via le CMH-I. Les LT CD4⁺ peuvent activer en retour les APC. Les LT CD8⁺ spécifiques vont se différencier en effecteurs cytotoxiques et les LT CD4⁺ en LT *helper* et migrer vers le site de l'infection ou la tumeur et lyser spécifiquement les cellules cibles (*adapté d'après (Smyth, Crowe et al. 2001)*).

3.1. Echappement tumoral à l'immunosurveillance

Malgré l'importance de ces mécanismes de reconnaissance de la tumeur, les cellules tumorales arrivent à s'échapper et proliférer. De nombreuses études montrent que le système immunitaire peut réguler et lyser les tumeurs à des étapes de développement précoces. Néanmoins, il y a de nombreux mécanismes d'inhibition de la réponse immunitaire et de modification de l'aspect des cellules tumorales qui conduit à l'échappement tumoral. Il a été montré que les LT CD8⁺ infiltrent de nombreuses tumeurs, confirmant le concept d'immunosurveillance des cellules tumorales. Toutefois, les tumeurs arrivent à progresser et à envahir l'organisme grâce à différents mécanismes d'échappement. Ce duel entre l'échappement tumoral et le système immunitaire constitue les bases du concept de l'*immunoediting* des cancers.

Ce concept, appelé plus communément, « la théorie des 3 E », a été mis en évidence par Schreiber et ses collaborateurs qui ont proposé un modèle de système immunitaire qui élimine les tumeurs à forte immunogénicité. De ce fait, cela favorise le développement de tumeurs peu immunogènes et/ou ayant acquis des propriétés leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire (Dunn, Old et al. 2004; Schreiber, Old et al. 2011). Lors de la formation de la tumeur, il y a des interactions complexes entre le système immunitaire de l'hôte et ce qui engendre trois phases distinctes : une phase d'élimination, une phase d'équilibre et une phase d'échappement (**Fig. 6**).



Phase d'élimination

Phase d'équilibre

Phase d'échappement

Figure 6. Le concept de l'immunoediting. L'immunoediting comprend 3 phases. La 1ere phase correspond à la lyse partielle des cellules tumorales. Ensuite, à partir des cellules résistantes à la lyse, vont émerger de nouveaux mutants tumoraux résistants, c'est la phase d'équilibre. A la fin de cette étape, les cellules tumorales peu immunogènes, vont acquérir des capacités invasives conduisant à l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, elles vont proliférer et métastaser d'autres sites (*d'après (Dunn, Old et al. 2004).*

3.1.1. Phase d'élimination

La phase d'élimination est similaire au processus d'immunosurveillance des tumeurs. Le système immunitaire repère le développement d'une tumeur à l'aide de signaux de danger dits DAMP (*Danger-Associated Molecular Pattern*) présents dans le microenvironnement. Ces derniers activent les récepteurs des cellules de l'immunité innée qui vont alors sécréter des cytokines inflammatoires, aidant le recrutement des cellules de l'immunité adaptative (Kepp, Tesniere et al. 2009; Langers, Renoux et al. 2012). De plus, les Ag tumoraux présentés par les APC permettent d'activer non seulement une réponse cellulaire telles que les T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques, mais aussi une réponse humorale comme impliquant la cytotoxicité des lymphocytes dépendante des anticorps (ADCC « antibody-dependent cell cytotoxicity ») (Clynes, Towers et al. 2000) (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002; Kelly, Darcy et al. 2002). Les souris qui présentent un défaut de formation des LT, tels que les souris Rag2^{-/-}, développent des sarcomes spontanés plus rapidement et plus souvent comparé aux souris sauvages traitées avec le carcinogène chimique méthylcholanthrène (MCA) (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Ces observations montrent le rôle primordial de la réponse immunitaire adaptative dans la protection de l'organisme contre la formation de cancer. Par ailleurs, des résultats similaires sont obtenus chez les souris transgéniques pour le gène *RAE1* et déficientes pour le gène *J18* qui présentent respectivement un défaut de NK et une déficience en cellules tueuses naturelles T (NKT) (Smyth, Thia et al. 2000). Ce qui montre que ces agents de la réponse immunitaire innée sont importants dans la réponse antitumorale. Dans les tumeurs cutanées, les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunosurveillance grâce à leur récepteur activateur NKG2D (Oppenheim, Roberts et al. 2005). Il a été aussi montré que les cellules lymphocytaires étaient aussi importantes dans l'immunosurveillance, par la sécrétion d'interféron (IFN) et de perforine qui sont impliqués dans la lyse des cellules tumorales et dans l'inhibition de la formation des métastases (Smyth, Thia et al. 2000; Street, Cretny et al. 2001; Oppenheim, Roberts et al. 2005).

Pendant cette étape, la tumeur peut être entièrement éliminée par le système immunitaire. Néanmoins, quelques cellules tumorales arrivent à échapper au système d'immunosurveillance en générant de nouvelles populations tumorales génétiquement instables.

3.1.2. Phase d'équilibre

La phase d'équilibre est caractérisée par une période de latence de la réponse immunitaire après l'élimination partielle de la tumeur due au mécanisme d'échappement tumoral. Il est possible que cette phase de latence tumorale se prolonge sur de plusieurs années, voire pendant toute la vie de l'hôte, car elles ne sont pas capables de se développer en masse tumorale à cause de la pression exercée par le système immunitaire. Dans les tumeurs solides, la période d'équilibre peut atteindre jusqu'à 20 ans entre la première exposition à l'agent carcinogène et la détection clinique de la tumeur (Loeb, Loeb et al. 2003). Durant cette phase, il a été montré la présence d'une activité immunosuppressive des cellules de l'immunité, ce qui a engendré une sélection de clones tumoraux résistants. Lors du processus d'échappement, les cellules malignes présentent une plus faible immunogénicité et peuvent ainsi proliférer et survivre. En même temps, les lymphocytes sont dépassés et ne peuvent plus bloquer l'apparition de néo-tumeurs. De plus, chez des souris traitées avec de faibles doses de MCA, il a été rapporté que les cellules malignes se développent sans apparition d'une tumeur apparente sur une longue période (Nishikawa and Sakaguchi 2010). Pour mieux comprendre l'impact de la réponse adaptative sur l'immunogénicité, des tumeurs ont été induites avec le MCA dans des souris déficientes pour le gène *Rag2* et dans des souris sauvages, puis les greffons ont été transplantés soit dans des souris *Rag2*^{-/-} et soit dans des hôtes sauvages. Le greffon *Rag2*^{-/-} transplanté dans les souris *Rag2*^{-/-} et dans les souris sauvages se développent et croient de la même manière. Par contre, parmi les greffons obtenus dans les souris immunocompétentes, 40% des tumeurs *Rag2*^{-/-} sont éliminées au cours des 8 à 9 jours après transplantation, alors que toutes les tumeurs sauvages dérivées ont proliféré (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Ces résultats indiquent clairement que les tumeurs sauvages dérivent d'un mécanisme d'*immunoediting*, la réponse innée exerce aussi une pression sur l'immunité de la tumeur au cours de la phase d'équilibre favorisant les cellules les moins immunogènes. L'ensemble de ces études montre que la réponse adaptative modèle des variants résistants avec l'apparition de nouvelles mutations non reconnaissables par le système immunitaire (Smyth, Dunn et al. 2006) et ce grâce à leur faible immunogénicité.

3.1.3. Phase d'échappement

Pendant la phase d'équilibre, des variants tumoraux échappent à la pression de la réponse immunitaire et deviennent plus agressifs et prolifèrent. De nombreux processus peuvent expliquer comment la tumeur esquivé le système immunitaire. Tout d'abord, le microenvironnement tumoral peut induire des Treg du système immunitaire ou des facteurs immunosuppresseurs relargués par la tumeur elle-même. Ensuite, les cellules tumorales ont la capacité de subir des modifications génétiques et épigénétiques afin de conférer aux variants tumoraux une certaine résistance pour échapper à la détection et à l'élimination par le système immunitaire. Par exemple, la baisse d'expression de CMH-I, ayant pour conséquence un mauvais apprêtement de l'Ag (Algarra, Cabrera et al. 2000). A ce niveau de complexité, les cellules tumorales sont capables d'utiliser différentes stratégies d'échappement, intrinsèques ou extrinsèques, avant l'aboutissement à une forme maligne incontrôlable. Cela engendre des variants résistants qui entraînent une invasion tumorale et la formation de métastases. Au cours de l'immunothérapie fondée sur le transfert adoptif des cellules T activées, on observe la formation de variants tumoraux résistants comme au cours de l'échappement tumoral à la réponse immunitaire. En effet, les patients qui subissent une immunothérapie anticancéreuse récidivent, ce qui peut être associé à la perte d'expression de l'Ag ciblé. Effectivement, lors d'une étude clinique de vaccins ciblant le mélanome, les patients dont les tumeurs sont positives pour les deux Ag gp-100 et TRP-2, présentaient à la fin du traitement des variants tumoraux sans HLA de classe I et une disparition de ces deux Ag (Khong, Wang et al. 2004).

3.2. Mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance

Les travaux de Weinberg et ses collaborateurs ont montré que les cellules tumorales ont 6 caractères intrinsèques qui expliquent le développement tumoral. En effet, lors de l'apparition de la tumeur, les cellules cancéreuses acquièrent différentes caractéristiques telles que la production en facteurs de croissance, l'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de croissance, l'échappement aux différents processus d'apoptose, une aptitude répliquative illimitée, une capacité à favoriser une néo-angiogénèse et enfin une tendance à envahir les tissus et à engendrer des métastases (**Fig. 7**).

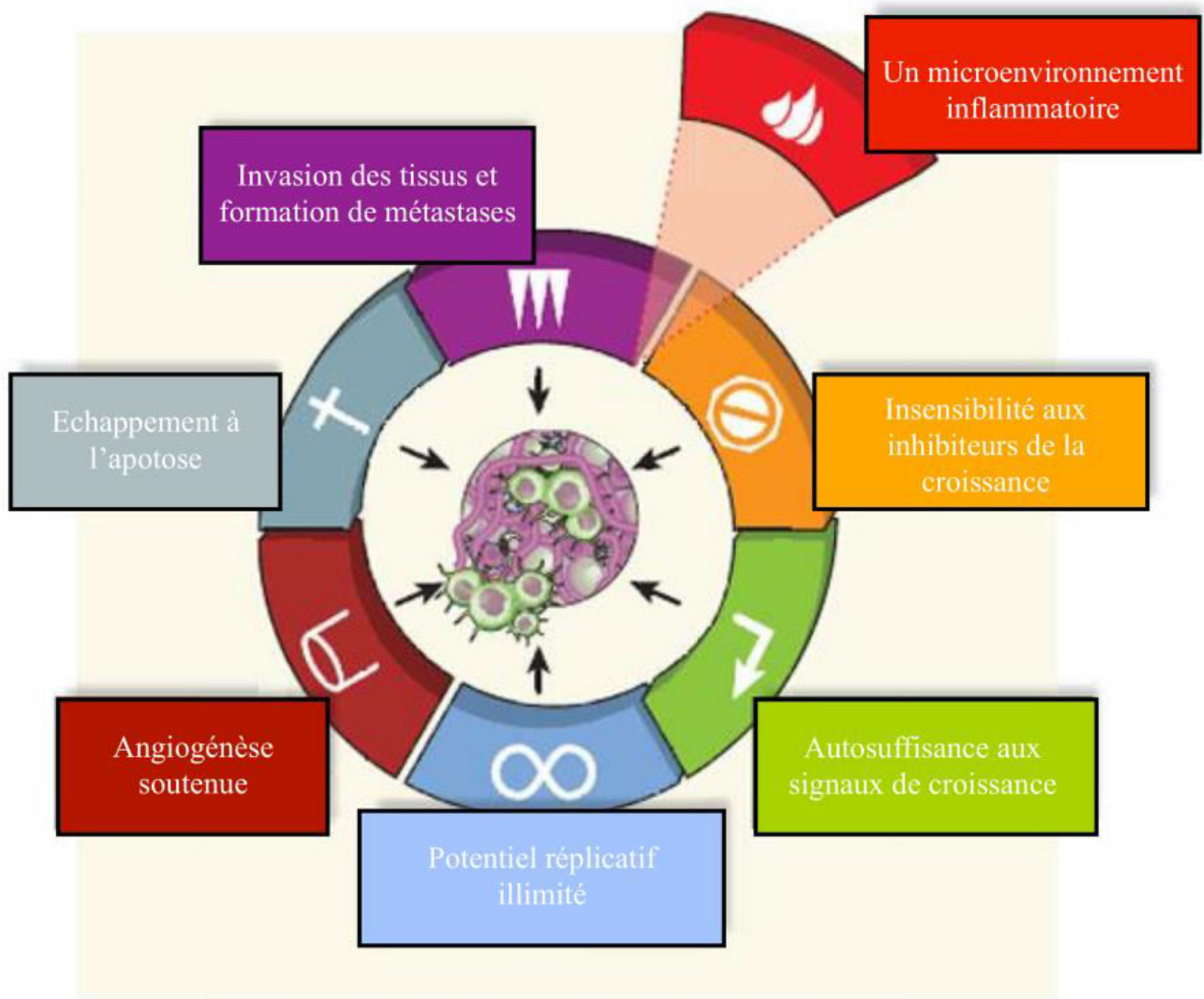


Figure 7. Les 7 propriétés du cancer. D'après les travaux d'Hanahan et de Weinberg (2000), les tumeurs acquièrent six propriétés différentes. Les tumeurs doivent être dans un microenvironnement riche en vaisseaux sanguins pour pouvoir se développer (angiogenèse). Les tumeurs sécrètent abondamment des facteurs de croissance afin de se diviser indéfiniment (pouvoir répliatif) et d'induire un échappement à l'apoptose et aux inhibiteurs de la croissance. De ce fait, cela aboutit à l'invasion des tissus et à la génération de métastases. La septième caractéristique des tumeurs est le développement d'un microenvironnement inflammatoire (d'après ((Mantovani, Allavena et al. 2008))).

La pression de sélection induite par le système immunitaire est forte et les cellules tumorales, à cause de leur instabilité génétique, peuvent dériver et former de nouveaux variants tumoraux (Dunn, Bruce et al. 2002). Il existe différentes stratégies mises en œuvre par les tumeurs afin de contourner l'immunosurveillance et même de la modifier à leur profit. Les clones résistants utilisent différents mécanismes d'échappement qui sont divisés en 3 catégories : les facteurs intrinsèques ou extrinsèques à la cellule tumorale ou présents dans le microenvironnement (Fig. 8).

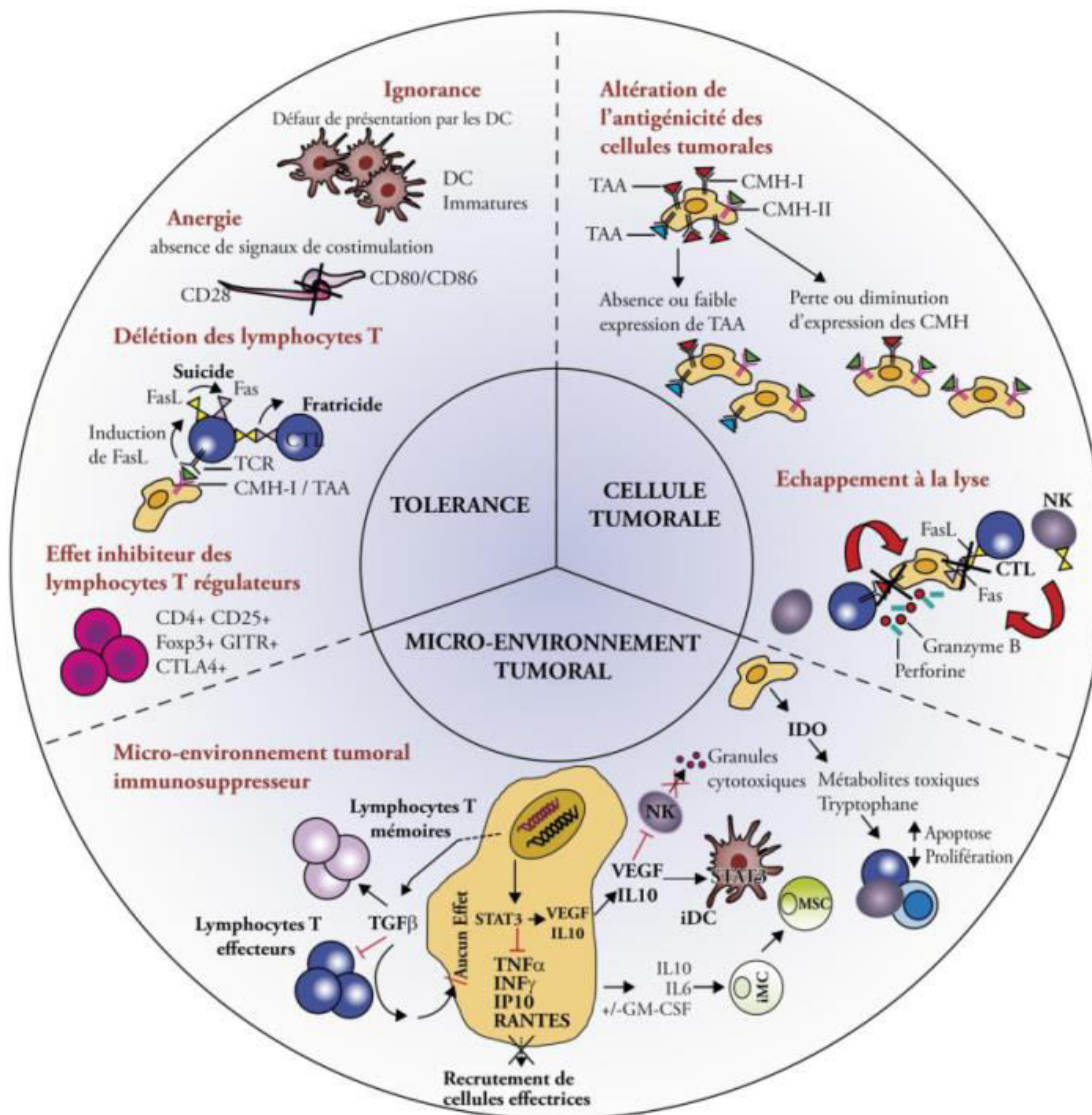


Figure 8. Les différentes voies d'échappement utilisées par les tumeurs. Les cellules tumorales développent différents mécanismes pour d'échapper à la reconnaissance et la lyse par les cellules immunitaires. Ces mécanismes peuvent être classés en différents groupes. Le premier groupe est composé de processus impliquant directement les cellules tumorales, tels que l'altération de l'antigénicité des cellules tumorales par perte ou la diminution de l'expression des molécules de CMH et l'acquisition d'une résistance à la lyse exercée par les CTL. Le second groupe comporte les processus bloquant les effecteurs de la réponse immunitaire induisant une tolérance, la délétion des CTL ou également le recrutement des cellules régulatrices telles que les cellules Treg, MDSC ou TAM. Enfin le dernier groupe correspond à la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur suite à la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs inhibant la réponse immunitaire efficace tels que l'IDO, l'IL-10 et le TGF-β ((El Hage, Abouzahr-Rifai et al. 2008))

3.2.1. Présentation inadéquate des antigènes par les cellules tumorales

De nombreuses études ont montré que le défaut de présentation d'Ag est fréquent dans une variété de tumeurs solides et hématopoïétiques (Ferrone and Marincola 1995; Garcia-Lora, Algarra et al. 2003; Campoli and Ferrone 2008). Cette voie d'échappement est la plus étudiée et elle est associée à de nombreuses causes, comme la perte de l'expression des molécules HLA ou l'altération des voies d'apprêtement des Ag (Seliger, Hohne et al. 1996). Le système immunitaire exerce une pression sur les cellules tumorales qui résulte d'une variation de l'expression de la molécule HLA tout au long du développement de la tumeur. L'absence d'expression de la molécule HLA est due, soit à une perte complète des haplotypes HLA-A, HLA-B et HLA-C, normalement présents, soit à une expression partielle avec une modification d'un seul allèle ou encore la perte d'un ou deux haplotypes (Koopman, Corver et al. 2000). Il existe de nombreux points de contrôle où il est possible d'observer ces anomalies : des défauts génétiques de la production des HLA, des changements épigénétiques de ces mêmes gènes et l'induction de voies de signalisation modulant leur expression (Garrido, Cabrera et al. 1993; Garrido, Ruiz-Cabello et al. 1997; Marincola, Jaffee et al. 2000). En effet, la formation et la progression tumorale ont été associées aux transformations épigénétiques des molécules HLA. Ainsi ces modifications impliquent un changement important dans l'expression des CMH-I (Magner, Kazim et al. 2000; Chang, Campoli et al. 2005; Khan, Gregorie et al. 2008). Un des principaux mécanismes épigénétiques identifiés au sein des tumeurs est la méthylation des cytosines dans les îlots CpG. Les histones jouent un rôle crucial, par acétylation ou par méthylation, dans l'expression des molécules du CMH-I, avec ou sans hyperméthylation des îlots CpG (Esteller 2006 ; Lettini, Guidoboni et al. 2007). De plus, il existe des agents pharmacologiques permettant d'induire l'hypométhylation de l'ADN et la désacétylation des histones, pouvant ainsi rétablir l'expression des gènes du CMH-I (Campoli and Ferrone 2008). La perte d'expression des protéines impliquées dans l'apprêtement des Ag est associée au développement tumoral (Seliger, Schreiber et al. 2001; Meissner, Reichert et al. 2005; Seliger 2008; Kamphausen, Kellert et al. 2010). Les cellules tumorales peuvent moduler l'expression des protéines impliquées dans la machinerie d'apprêtement des Ag. Les protéines les plus touchées sont LMP-2 (*low-molecular mass polypeptide-2*) et LMP-7 (*low-molecular mass polypeptide-7*) (Shen, Zhang et al. 2007), ainsi que ERAP1 (*Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase-1*) (Kamphausen, Kellert et al. 2010). Les sous-unités TAP1 (*Transporter associated with Ag Processing-1*) et TAP2 (*Transporter associated with Ag Processing-2*) jouent un rôle dans le transport des Ag dans le réticulum endoplasmique, et peuvent être modulées au sein des cellules tumorales (Seliger, Maeurer et

al. 2000; Seliger, Ritz et al. 2001). De plus, il a été montré *in vivo* que l'altération de la protéine TAP1 induit une prolifération tumorale (Johnsen, Templeton et al. 1999).

3.2.2. Inhibition de la réponse immunitaire par les cellules tumorales

Les cellules tumorales échappent à la réponse immunitaire grâce, d'une part à la diminution de l'expression des molécules du CMH à leur surface (Campoli and Ferrone 2008), d'autre part en agissant directement sur le système immunitaire en inhibant l'activité cytotoxique des CTL et aussi en modifiant le microenvironnement tumoral tel que par la sécrétion du TGF- β 1 (von Rahden, Stein et al. 2006).

3.2.2.1. Inhibition de l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques

L'efficacité de la réponse antitumorale dépend de la susceptibilité des cellules malignes à la lyse par les cellules T effectrices. De nombreuses études ont décrit les différents mécanismes de résistance à l'activité cytotoxique des CTL (Gati, Guerra et al. 2003). Ces mécanismes sont impliqués dans la résistance à l'apoptose ou dans l'induction d'une mort apoptotique des CTL.

3.2.2.1.1. Modulation des molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction avec les lymphocytes T

Afin d'induire une réponse cytotoxique spécifique et efficace, une interaction directe entre les CTL et les cellules tumorales est nécessaire. Les molécules d'adhérence telles que ICAM-1 ou la E-cadherine sont impliquées dans la stabilisation de la SI et la polarisation des granules cytotoxiques (Anikeeva, Somersalo et al. 2005; Le Floch, Jalil et al. 2007). Ainsi, dans le cancer de la tête et du cou, il y a une corrélation entre la surexpression d'ICAM-1 et la survie des patients. La perte de l'expression d'ICAM-1 favorise l'invasion tumorale et la formation de métastases (Shirai, Furukawa et al. 2003). De plus, des études ont montré que la surexpression d'ICAM-1 bloque la croissance tumorale et l'apparition de métastases (Tachimori, Yamada et al. 2005). Tandis que, dans le mélanome, sa perte d'expression entraîne l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT engendrant ainsi une résistance à la lyse exercée par les CTL. L'induction de l'expression d'ICAM-1 par l'IFN- γ peut restaurer cette lyse (Hamai, Meslin et al. 2008). De la même manière, dans le mélanome, des études ont montré une corrélation entre la sécrétion d'IL-2 et un défaut d'expression de la molécule d'adhérence LFA-3 (Guilloux, Viret et al. 1994). D'autres études ont montré que la perte d'expression de la E-cadherine sur les cellules tumorales d'origine épithéliale conduit à la

dissociation de l'épithélium, de manière plus significative, à une augmentation du potentiel invasif des cellules dans l'invasion tumorale et à la formation de métastases (Bussemakers and Schalken 1996). De manière intéressante, notre équipe a montré que l'interaction de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$, exprimée par les TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*), avec son ligand la E-cadhérine exprimé à la surface des cellules tumorales épithéliales est importante dans l'activité lytique des CTL antitumoraux en participant à la maturation de la SI cytotoxique (Bussemakers and Schalken 1996; Le Floc'h, Jalil et al. 2007)

3.2.2.1.2. Défaut de présentation antigénique par les DC

Les signaux de dangers émis par le microenvironnement tumoral sont importants pour la maturation des DC présentatrices d'Ag. Cependant, ces signaux sont souvent identifiés comme des signaux du soi entraînant un état de tolérance qui est dû à la présentation des Ag par les Dc immatures (Steinman, Hawiger et al. 2003; Gabrilovich 2004). Des études ont démontré que la neutralisation du facteur de transcription STAT3, induit une augmentation d'expression de facteurs pro-inflammatoires et de chimiokines facilitant l'activation des DC et la formation d'une réponse fonctionnelle antitumorale spécifique (Wang, Niu et al. 2004). L'équipe de Gabrilovich a montré que le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sécrété par les cellules malignes entraîne une inhibition de la maturation des DC, ce qui résulte à leur incapacité à stimuler les LT CD8⁺. De plus, une corrélation inverse entre l'expression de VEGF et le nombre des DC dans le sang périphérique et les TIL a été rapportée chez des patients atteints de divers types de cancers (Saito, Tsujitani et al. 1998; Almand, Resser et al. 2000), tels que les cancers gastriques et du poumon (Fan, Han et al. 2003; Takahashi, Kono et al. 2004). D'autres agents, tels que le M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), l'IL-6, l'IL-10 et le TGF- β (*Tumor growth factor*), sécrétés par les cellules tumorales, les Treg ou les macrophages, entraînent l'arrêt de la différenciation des DC (Menetrier-Caux, Montmain et al. 1998 ; Hayashi, Hideshima et al. 2003) et une diminution de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 (Steinbrink, Wolfl et al. 1997 ; Geissmann, Revy et al. 1999).

3.2.2.1.3. Résistance à la lyse

Les tumeurs peuvent aussi échapper à la réponse CTL en développant une résistance à la voie de dégranulation et (Radoja, Saio et al. 2001) à la voie des récepteurs à domaine de mort. Il a été montré que l'expression de la serpine PI-9 (*protease inhibitor 9*) par les cellules tumorales

neutralise la voie perforine/Granzyme dans les lignées de cancer du sein, du cerveau et le mélanome (Medema, de Jong et al. 2001; Bladergroen, Meijer et al. 2002 ; van Houdt, Oudejans et al. 2005). Dans les conditions normales, ce sont les LT qui expriment la PI-9 et son homologue murin (SPI-6) afin de se protéger de la mort apoptotique. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les cellules tumorales se protègent de l'apoptose induite par la voie perforine/Granzyme, en diminuant l'expression de protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Apaf-1 ou la caspase 8) ou encore en surexprimant les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 et IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)) (Debatin and Krammer 2004 ; Zhang and Rosdahl 2006). De plus, des études ont montré que la sécrétion d'IFN de type I et II par les cellules tumorales induit une résistance à la lyse exercée par la voie de dégranulation en inhibant la perméabilisation de la membrane par la perforine et bloquant l'incorporation du granzyme-B (Hao, Beguinot et al. 2001 ; Willberg, Ward et al. 2007 ; Hallermalm, Seki et al. 2008). Les voies Fas et TRAIL sont impliquées aussi dans la résistance à l'apoptose dans de nombreux modèles tumoraux, en particulier le mélanome métastatique, grâce à la baisse d'expression des récepteurs de mort (Fas, TNF-R, TRAIL-R ou DR4/5) (Griffith, Chin et al. 1998; Gronbaek, Straten et al. 1998 ; Do, Lossos et al. 2003 ; Jin, McDonald et al. 2004 ; Kim, Emi et al. 2004 ; Wohlfart, Sebinger et al. 2004). De plus, l'expression de molécules solubles par les cellules tumorales interfèrent avec Fas ou Fas-L et est associée à un mauvais pronostic (Landowski, Qu et al. 1997; Peli, Schroter et al. 1999 ; Ugurel, Rappl et al. 2001). Aussi, la pression exercée par le système immunitaire contribue à la sélection de variants tumoraux n'exprimant pas ou peu Fas, cela en éliminant seulement les variants qui expriment fortement Fas (Reichmann 2002). De plus, les cellules tumorales acquièrent une résistance à la cytotoxicité exercée par les récepteurs à domaine de mort, en surexprimant des protéines, comme c-FLIP ou PEA-15, bloquant l'activation de la procaspase-8 ou son interaction avec le complexe FADD (Irmeler, Thome et al. 1997 ; Griffith, Chin et al. 1998; Zhang, Franco et al. 1999 ; Geserick, Drewniok et al. 2008). Les mutations des gènes codant pour la procaspase-8 (Hopkins-Donaldson, Ziegler et al. 2003) et Apaf-1 induisent aussi une résistance à la lyse exercée par les CTL (Huerta, Heinzerling et al. 2007). L'équipe de Zhang a montré une corrélation entre la progression tumorale et la surexpression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL), en particulier dans le mélanome primitif et dans la tumeur métastatique, ou la perte d'expression de molécules anti-apoptotiques (Bak/Bax et FADD) (Zhang and Rosdahl 2006).

3.2.2.1.4. Dysfonctionnement des lymphocytes T CD8⁺

De nombreuses études ont montré que le dysfonctionnement des LT spécifiques de la tumeur peut être dû à l'expression des récepteurs inhibiteurs (CD94/NKG2A et les KIR) (Guerra, Guillard et al. 2000; Gati, Guerra et al. 2001 ; Groh, Wu et al. 2002). Dans différents types de tumeurs, tel que le mélanome, la perte d'expression du récepteur activateur NKG2D est associée à un défaut d'activation des LT CD8⁺ (Groh, Wu et al. 2002). Toutefois, des études faites chez des souris déficientes pour les récepteurs inhibiteurs KIR, ont révélé leurs implications dans la formation de LT de phénotype mémoire (Tm1) à partir des cellules T CD8⁺ naïves, ce qui leur permettrait de se protéger de l'AICD (Ugolini, Arpin et al. 2001; Ugurel, Rappl et al. 2001). De plus, les LT CD8⁺ perdent leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales suite à un défaut de la voie de signalisation perforine/granzyme ou aussi suite à une altération de la sécrétion de l'IFN- γ . Il existe d'autres mécanismes induisant la mort des CTL suite à l'expression par les cellules tumorales de molécules inhibitrices tel que B7-H1 (aussi appelé PD-L1) ligand du récepteur PD-1 qui est exprimé à la surface des CTL. En effet, la liaison de PD-1 à ses ligands PD-L1 ou PD-L2 entraîne une diminution de l'expression membranaire du TCR puis la mort des effecteurs T CD8⁺ favorisant ainsi l'échappement tumoral (Dong, Strome et al. 2002 ; Dong and Chen 2003 ; Konishi, Yamazaki et al. 2004 ;Blank, 2005). De plus, il existe plusieurs membre de la famille B7, qui ont été détectés dans de nombreux types de cancers permettant de bloquer la prolifération et l'activité lytique des CTL (Sica, Choi et al. 2003 ; Sun, Wang et al. 2006 ; Cheng, Jiang et al. 2009). Je reviendrai plus en détail sur les molécules « checkpoint » du système immunitaire dans le chapitre **III**. Par ailleurs, il a été montré que la molécule RCAS1 (*Receptor-binding Cancer Antigen expressed on Siso cells*), exprimée par plusieurs types de cellules cancéreuses (Takahashi, Iizuka et al. 2001 ; Sonoda 2011), bloque la croissance et induit l'apoptose des LT en déclenchant la libération du cytochrome c et le clivage de la procaspase-3 (Nakashima, Sonoda et al. 1999 ; Nishinakagawa, Fujii et al. 2010). Enfin, les cellules T CD8⁺ peuvent phagocytter des cellules autologues selon un processus appelé «cannibalisme» qui correspondrait à un mécanisme d'élimination des LT. Elle se produit quand les conditions du microenvironnement sont défavorables à leur croissance (Lugini, Matarrese et al. 2006).

3.2.2.2. Les mécanismes d'échappement intrinsèques aux cellules tumorales

Lors de la réponse immunitaire, les tumeurs utilisent de nombreux mécanismes pour esquiver l'immunosurveillance antitumorale. Ces mécanismes d'inhibition engagent le recrutement de

cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral qui vont bloquer l'activité cytotoxique des cellules T. Par exemple, l'expression de cytokines telles que l'IL-10 et le TGF- β qui sont secrétées par les cellules Treg recrutées dans les tumeurs afin de bloquer la prolifération des cellules T effectrices. De la même manière, les MDSC recrutées dans le microenvironnement tumoral peuvent sécréter des cytokines inhibitrices qui neutralisent la réponse antitumorale et des cytokines pro-tumorigènes qui favorisent le développement de la tumeur (Sevko and Umansky 2013). En plus, les cellules tumorales sécrètent des molécules inhibitrices dans le microenvironnement tumoral telles que l'IL-6 et l'IL-10 (Gastl, Abrams et al. 1993), et miment les LT en exprimant différents ligands pour des récepteurs inhibiteurs présents sur la surface des cellules T tel que PD-L1.

3.2.2.2.1. Production de cytokines immunosuppressives

Les cellules tumorales participent aussi à la formation d'un microenvironnement tumoral immunosuppressif, en sécrétant de nombreuses molécules inhibitrices telles que l'IL-10, le VEGF ou le TGF- β 1, le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), la protéine Indoleaminepyrrole 2,3 dioxygénase (IDO) (Mueller and Fusenig 1999 ; Ugurel, Rappl et al. 2001; Mellor and Munn 2004; von Rahden, Stein et al. 2006 ; Lob, Konigsrainer et al. 2009). Ces molécules peuvent être exprimées par les cellules tumorales elles-mêmes ou les cellules voisines qui composent le microenvironnement. De plus, ces facteurs proviennent aussi des cellules hématopoïétiques migratoires notamment les cellules NK, les cellules T, les neutrophiles, les macrophages, les DC et les Treg (Kiessling, Wasserman et al. 1999). De plus, la tumeur induit l'hypoxie au sein du microenvironnement entraînant la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 et l'IL-17. Ces derniers favorisent les interactions avec le tissu sain de l'hôte. Les cellules tumorales épithéliales expriment une quantité conséquente de TGF- β 1 qui joue différents rôles en fonction de la nature de la cible, notamment dans l'activation ou l'inhibition de la croissance, l'apoptose et la différenciation cellulaire (Chen, Frank et al. 2001). De plus, le TGF- β induit l'épuisement des cellules T et l'expansion des Treg (Li, Samanta et al. 2006). Toutefois, le TGF- β 1 peut avoir un rôle positif dans l'activation de la réponse immunitaire antitumorale. En effet, mon équipe a montré que le TGF- β 1 active les LT CD8 grâce à l'induction de l'intégrine CD103 (Le Floc'h, Jalil et al. 2007). Des études ont montré que l'IL-10 présent dans le sérum de patients atteints de cancers induit non seulement l'arrêt de la maturation et de la fonctionnalité des DC, en neutralisant la sécrétion de l'IL-12, mais aussi l'épuisement des CTL spécifiques (Steinbrink, Wolfl et al. 1997 ; Steinbrink, Graulich et al. 2002). La

molécule VEGF est connue pour son rôle pro-angiogénique, mais elle a aussi été décrite dans de nombreux cancers comme le cancer du sein, du poumon et du rein, pouvoir bloquer la différenciation et la maturation des DC en neutralisant le facteur de transcription NF- κ B (Ohm, Gabrilovich et al. 2003). De plus, l'augmentation du VEGF est associée à la diminution du nombre de DC et correspond à un mauvais pronostic dans de nombreux modèles de cancers (Saito, Tsujitani et al. 1998 ; Chow and Rabie 2000 ; Gorski, Leal et al. 2003).

3.2.2.2.2. Immunosuppression exercée par les lymphocytes T régulateurs

En 1970, Gershon et ses collègues ont émis le concept de la suppression immunitaire par les cellules Treg. Ces cellules jouent un rôle primordial dans le maintien de la tolérance périphérique, le blocage de l'inflammation, la prévention des maladies auto-immunes et également dans le maintien de la grossesse (Valitutti 2008). En plus, les Treg jouent un rôle essentiel dans l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire. Il a été montré que les Treg qui expriment le récepteur CCR4 à la surface sont attirés dans le microenvironnement tumoral par la chimiokine CCL22, sécrétée par les cellules tumorales et les macrophages infiltrants (Iellem, Mariani et al. 2001 ; Curiel, Coukos et al. 2004 ; Lee, Wang et al. 2005). Bien que les Treg les plus étudiés soient les LTreg CD4⁺, il existe également des LTregs T CD8⁺ (Lu, Werneck et al. 2006). Ces premières se caractérisent par une forte expression de GITR, du facteur de transcription FoxP3 (Fontenot, Gavin et al. 2003 ; Hori, Nomura et al. 2003 ; Khattri, Cox et al. 2003 ; Walker, Kasprowicz et al. 2003), et CD25 ainsi qu'une faible expression de CD127. Les cellules Treg utilisent différents mécanismes d'immunosuppression tels que la sécrétion de molécules comme l'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β 1. Cela conduit à la perturbation métabolique par l'arrêt de l'expression de nombreuses cytokines essentielles à la croissance des cellules T, comme l'IL-2 et l'IL-7 (Pandiyani, Zheng et al. 2007), à l'élimination des cellules T effectrices et des DC par l'intermédiaire des granzymes, TRAIL et de la galectine-1 (Grossman, Verbsky et al. 2004 ; Garin, Chu et al. 2007 ; Ren, Ye et al. 2007). De même, un défaut de la fonction APC qui à son tour engendre une mauvaise activation des lymphocytes T, a été rapportée (Strobl and Knapp 1999 ; Fallarino, Grohmann et al. 2003 ; Hori, Nomura et al. 2003). De plus, le TGF- β 1 joue un rôle dans l'arrêt de la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires innées et adaptatives (Joffre, Santolaria et al. 2008). Par ailleurs, les cellules cancéreuses secrètent de l'IL-10 et du TGF- β 1, ce qui facilite la formation de Treg à partir de LT naïfs (Chen, Jin et al.

2003 ; Chen, O'Shaughnessy et al. 2003 ; Walker, Kasprowicz et al. 2003 ; Fantini, Becker et al. 2004 ; Marie, Letterio et al. 2005; Huang, Pan et al. 2006). Ces derniers de phénotype $CD4^+/CD25^-/Foxp3^-$, peuvent être convertis en Treg au niveau du site tumoral (Walker, Kasprowicz et al. 2003 ; Walker, Carson et al. 2005). En revanche, il a été montré dans un modèle murin que les lymphocytes T CD4 effecteurs ne pouvaient se transformer en Treg au niveau du site tumoral (Sainz-Perez, Lim et al. 2012), ce résultat a été également observé dans un modèle humain de cancer de l'ovaire (Ayyoub, Pignon et al. 2013). Les Tregs expriment aussi CTLA-4 qui joue un rôle dans la neutralisation des molécules de costimulation qui induit une diminution de l'activation des cellules T cytotoxiques (Wing, Onishi et al. 2008). De plus, CTLA-4 induit les molécules impliquées dans l'échappement tumoral comme l'enzyme IDO qui possède des fonctions immunosuppressives (Valitutti, Coombs et al. 2010). Les Tregs ont été identifiées dans le sang périphérique ou dans les TIL de patients atteints de nombreux cancers comme le cancer du poumon (Woo, Chu et al. 2001), de la prostate, du sein (Liyanage, Moore et al. 2002), du pancréas, du foie, de l'ovaire et de la peau (Micheau and Tschopp 2003 ; Sasada, Kimura et al. 2003 ; Curiel, Coukos et al. 2004; Wang, Lee et al. 2004 ; Wang, Niu et al. 2004 ; Sakaguchi 2005 ; Bates, Fox et al. 2006 ; Hiraoka, Onozato et al. 2006 ; Wang, Lau et al. 2009). De plus, ces cellules ont été observées dans de nombreuses tumeurs hématologiques comme par exemple la maladie de Hodgkin, la LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique), la AML (Leucémie aiguë myéloïde) et la CML (Leucémie aiguë Chronique) (van den Broek, Kagi et al. 1996 ; Igney and Krammer 2002 ; Street, Hayakawa et al. 2004 ; Cullen, Brunet et al. 2010). Des études ont montré une corrélation entre la formation de tumeurs solides et le niveau élevé de cellules Tregs qui est associé à un pronostic défavorable (Curiel, Coukos et al. 2004; Wang and Wang 2007). Cependant, l'équipe de Claude le Claire a montré que la présence des Treg est associé à un pronostic favorable dans le cancer de l'ovaire (Sato, Olson et al. 2005). De plus, une étude a montré que la présence des Treg dans le cancer du colon n'avait aucun effet sur la survie (Tosolini, Kirilovsky et al. 2011). L'ensemble de ces résultats montrent que les Treg sont un marqueur de bon/mauvais pronostic en fonction du type tumoral. En revanche, dans les tumeurs hématologiques, il n'y a pas de corrélation nette entre les cellules Tregs et un mauvais pronostic car le rôle joué par les cellules Tregs dans l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale est très complexe (Valitutti, Coombs et al. 2010).

3.2.2.2.3. Immunosuppression exercée par les cellules myéloïdes suppressives

En 2007, des études ont identifié une autre population cellulaire ayant une fonction immunosuppressive : les MDSC, qui ont la capacité d'inhiber la réponse immunitaire chez des patients cancéreux (Cobbs, Whisenhunt et al. 2003 ; Peranzoni, Zilio et al. 2010). De nombreux groupes ont décrit cette population hétérogène de cellules immatures (progéniteurs myéloïdes, des neutrophiles, des monocytes et des DC) dans différents cancers et d'autres maladies, mais il n'y avait pas de consensus sur l'appellation de ces cellules (Gabrilovich, Bronte et al. 2007). De plus, il a été montré qu'il existait une corrélation entre le nombre de MDSC dans le sang périphérique de patients atteints de différents types de cancers (Almand, Clark et al. 2001), tels que le cancer du sein et du poumon, dans la suppression de la réponse des cellules T spécifiques de l'Ag et donc pourraient être impliqués dans le mécanisme d'immunosuppression dans le cancer. Ces derniers sont caractérisés chez la souris par l'expression des molécules CD11b et de Gr1 (Liu, Van Ginderachter et al. 2003). Tandis que chez l'homme leur profil phénotypique est $\text{LIN}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD14}^+$ ou $\text{CD11b}^- \text{CD33}^+$ (Almand, Clark et al. 2001). De plus, la formation des MDSC est induite par la présence de CTL activées, de cytokines et de facteurs de croissance sécrétés dans le site tumoral (comme le GM-CSF, l'IL-3, le M-CSF, l'IL-6 ou le VEGF) (Bronte, Chappell et al. 1999; Liu, Van Ginderachter et al. 2003). Les MDSC régulent la réponse immunitaire de différentes façons, dans des modèles de souris et dans des maladies humaines *via* les LT CD8^+ , les cellules NK, les cellules B et les DC (Hoechst, Voigtlaender et al. 2009 ; Hu, Gan et al. 2011 ; Green, Cook et al. 2013), en sécrétant différentes cytokines immunosuppressives, mais aussi des dérivés de l'oxygène (Gabrilovich 2009). En plus, elles favorisent la différenciation de cellules T CD4^+ en cellules Treg (Huang, Pan et al. 2006). Les MDSC induisent l'immunosuppression des cellules T par induction des cellules Tregs et en bloquant l'activité cytotoxique des cellules T lors du *homing* par la dégradation des molécules L-sélectine exprimées à la surface des cellules T (Nagaraj, Gupta et al. 2007; Tadmor, Attias et al. 2011). De manière intéressante, l'équipe de Nagaraj a montré que les MDSC bloquent uniquement les cellules T spécifiques des Ag qui sont présentés par les MDSC (Nagaraj, Collazo et al. 2009; Molon, Ugel et al. 2011). De plus, elles favorisent l'expansion de la tumeur par la formation de vaisseaux sanguins, la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, tel que le VEGF, et aussi parce qu'elles se différencient en cellules endothéliales afin de faciliter la vascularisation de la tumeur (Nagaraj, Gupta et al. 2007; Tadmor, Attias et al. 2011). En conclusion, ces résultats suggèrent un potentiel important de cibler les MDSC pour améliorer les effets de l'immunothérapie antitumorale.

3.2.2.2.4. Les Macrophages Associés aux Tumeurs

Des études ont montré l'existence d'une population tumorale de macrophages homologues aux macrophages retrouvés dans les tissus sains qui s'appellent les macrophages associés aux tumeurs (TAM). C'est une population prototypique de phénotype M1 et M2 (Nagaraj, Collazo et al. 2009). Elles sont caractérisées par la faible capacité à tuer les cellules tumorales, la présentation des Ag aux cellules T et de produire des cytokines induisant la prolifération et les fonctions antitumorales des LT et des cellules NK. En plus, elle joue un rôle direct dans l'échappement des cellules tumorales à la réponse immunitaire (Sica, Schioppa et al. 2006). L'équipe de Hagemann a montré que les TAM peuvent entraîner l'invasion tumorale grâce à la stimulation de la production de métalloprotéinases par les tumeurs (Hagemann, Robinson et al. 2004). En plus, elles peuvent sécréter de nombreux facteurs de croissances qui induisent la croissance des cellules tumorales (O'Sullivan, Lewis et al. 1993 ; Goswami, Sahai et al. 2005 ; Tsutsui, Yasuda et al. 2005 ; Wang, Peng et al. 2005 ; Murdoch, Muthana et al. 2008) et des cytokines pro-angiogéniques (VEGF, TNF- α , β FGF) qui jouent un rôle dans la vascularisation de la tumeur (Bingle, Brown et al. 2002 ; Leek and Harris 2002 ; Mantovani, Sozzani et al. 2002 ; Hagemann, Wilson et al. 2005). De plus, elles reconnaissent la molécule d'inhibition B7-H4 (VTCN1, B7x, B7s) exprimée par les cellules cancéreuses et facilitent ainsi l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire (Chen, Qu et al. 2012). Dans des souris déficientes pour les TAM porteuses d'une tumeur mammaire, on observe une diminution de la dissémination des tumeurs, ce qui suggère leur rôle dans la formation des métastases (Lin, Nguyen et al. 2001). En effet, les Tregs combinés aux cellules tumorales produisent des cytokines tels que GM-CSF, d'IL-10 et de TGF- β qui induisent la différenciation spécifique des TAM vers un phénotype inhibiteur de type M2 (Elgert, Alleva et al. 1998).

3.2.2.2.5. Les cellules NKT

Les cellules NKT correspondent à une population de cellules exprimant deux types de récepteurs, le TCR et les récepteurs spécifiques aux cellules NK, et ont une fonction lytique similaire à ces dernières (Berzofsky and Terabe 2008). Deux types de cellules NKT : NKT type 1 et NKT type 2 ont été caractérisées. Il a été montré que les souris C57BL/6 déficientes pour les cellules NKT (CD1^{-/-}), traitées au MCA, développent plus de tumeurs que les souris sauvages (Smyth, Crowe et al. 2001). En effet, l'activité antitumorale des cellules NKT n'est pas expliquée grâce à leur aptitude à lyser directement leurs cibles tumorales, mais surtout grâce à leur capacité à sécréter de l'IFN- γ et de recruter des LT CD8⁺ effecteurs et des

cellules NK (Smyth, Crowe et al. 2002) de type 1 (Terabe, Swann et al. 2005). Toutefois, des études ont identifié des NKT de type 2 ayant un rôle immunosuppresseur et qui sont impliqués dans l'échappement tumoral au système immunitaire par l'implication de la cytokine IL-13 dans la voie de signalisation IL-4R/STAT6 (Terabe, Matsui et al. 2000). L'ensemble de ces résultats montrent que les NKT peuvent avoir un rôle anti ou pro-tumorale en fonction de la composition du microenvironnement tumorale.

Chapitre II

II. LES INTEGRINES

1. Les intégrines : généralités

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1 formant un récepteur hétérodimérique qui joue un rôle primordial dans la formation de jonctions d'adhérence entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC) ou une autre cellule. Elles sont aussi engagées dans plusieurs autres mécanismes essentiels au fonctionnement de la cellule telle que la migration, l'invasion, la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans l'induction de plusieurs voies de signalisation. Cette induction peut entraîner non seulement un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (un signal « *outside-in* ») qui est semblable aux autres voies de signalisation classiques, mais aussi un signal de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (un signal « *inside-out* »), afin de réguler la fixation des cellules dans le microenvironnement cellulaire et de modifier la structure de la MEC à l'aide des enzymes appelées métalloprotéinases matricielles. De plus, des études ont montré que les intégrines induisent différents signaux régulateurs qui modulent de nombreux processus biologiques et cellulaires, comme par exemple la croissance, la maturation ainsi que l'apoptose (Schwartz, Schaller et al. 1995).

Les intégrines sont aussi des molécules très importantes dans la réponse immunitaire. En effet, elles ont un rôle prédominant dans la migration des lymphocytes dans les tissus et leur activation, dans la formation de la SI et dans l'activité lytique des cellules immunitaires. Les intégrines sont composées de deux sous-unités, une sous-unité α et une sous-unité β qui sont liées avec des liaisons covalentes. Chez les vertébrés, on dénombre 24 intégrines différentes qui sont le résultat des nombreuses combinaisons entre les 18 sous-unités α et les 8 sous-unités β . Elles ont toutes une distribution tissulaire différente bien spécifique (Hynes 2002 ; Barczyk, Carracedo et al. 2010) (**Fig. 9**).

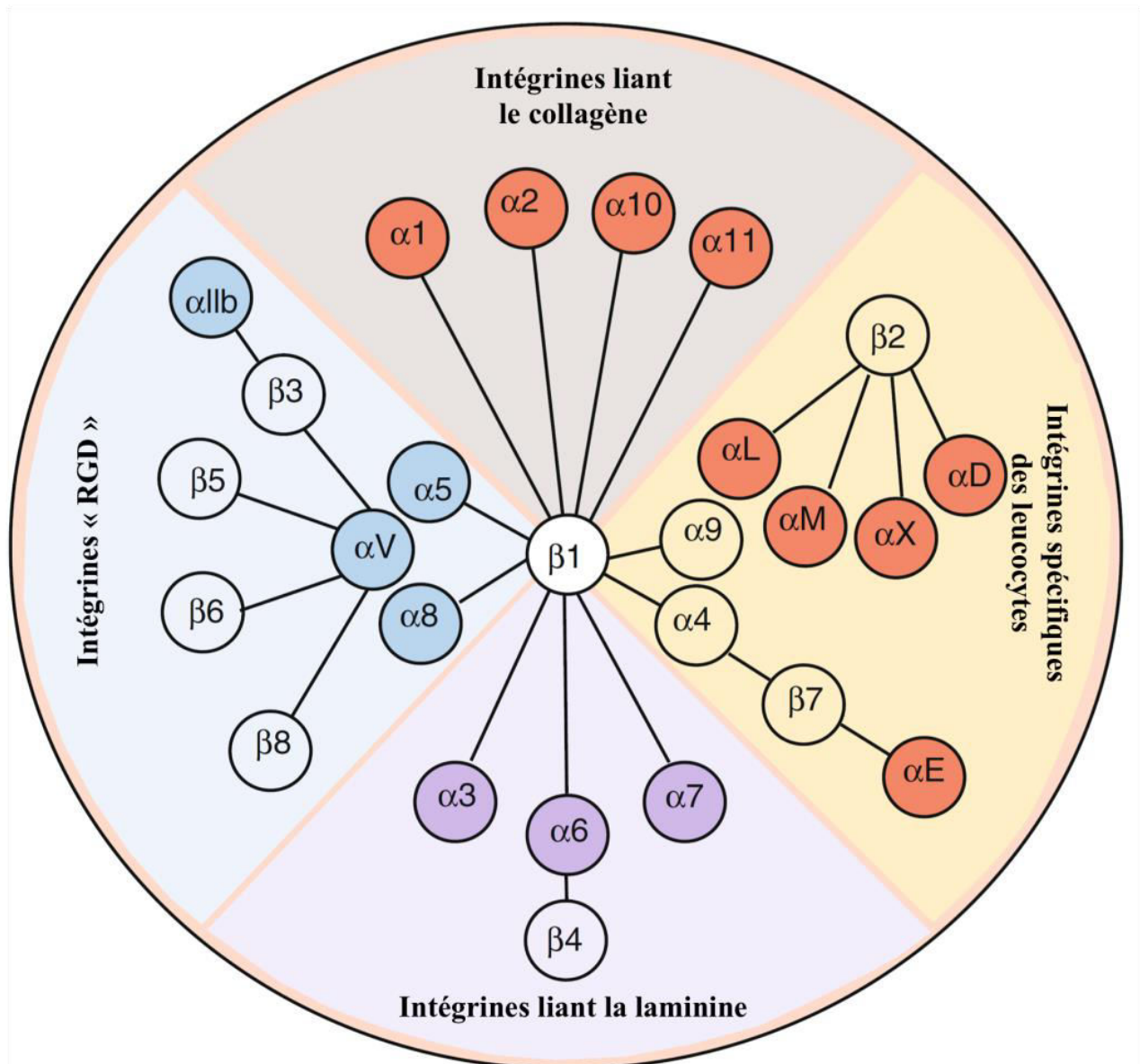


Figure 9. Représentation de la famille des intégrines. Chez les vertébrés, on compte 24 intégrines distinctes résultant de la combinaison de 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . On peut classer les intégrines en 4 groupes en fonction de leur spécificité de ligand ou leur localisation tissulaire. On retrouve les intégrines qui interagissent avec la Laminine, les intégrines liant le Collagène, les intégrines qui reconnaissent la séquence Tripeptidique RGD qui est retrouvée dans les séquences de molécules comme la Laminine ou la Fibronectine. Egalement, les intégrines qui sont exprimées par les leucocytes et interagissent avec des protéines de la MEC (Fibronectine), des membres de la superfamille des Ig tels que VCAM-1 et ICAM, et aussi engagées dans des interactions cellulaires. (D'après (Barczyk, Carracedo et al. 2010)).

Les sous-unités α et β sont différentes entre elles au niveau de leur séquence. Néanmoins on observe au niveau des sous-unités α une homologie de séquence de 30% et de 45% pour les sous-unités β . La diversité fonctionnelle des intégrines dans la reconnaissance de différents

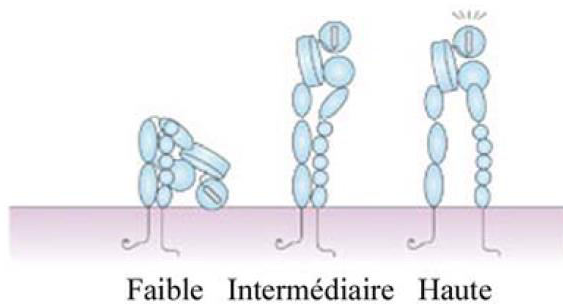
ligands, dans l'interaction avec différents acteurs du cytosquelette et dans l'activation de nombreuses voies de signalisation, est possible grâce à la variabilité des structures des sous-unités α et β .

En ce qui concerne les cellules immunitaires, on observe 10 intégrines qui appartiennent aux sous-familles β_1 , β_2 et β_7 et. De manière intéressante, les intégrines des sous-familles β_2 et β_7 sont exprimées uniquement dans les lymphocytes. En revanche, les intégrines de la sous-famille β_1 sont exprimées par différents types cellulaires. Il existe des intégrines qui sont spécifiquement exprimées par les leucocytes tels que Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$), LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) et VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) et qui ont un rôle bien précis dans le *homing*, mais également dans la maturation et l'activation cellulaire. L'intégrine LFA-1 se lie spécifiquement aux ligands de la famille ICAM (1-5) (*Intercellular Adhesion Molecule*) qui sont exprimés principalement par les cellules endothéliales vasculaires, tandis que VLA-4 se lie uniquement au ligand VCAM-1/CD106 (*Vascular cell adhesion molecule*). Les intégrines sont composées de trois régions, une région extracellulaire large qui interagit avec les composantes de la MEC, comme la laminine, la fibronectine, le collagène ou encore des récepteurs cellulaires (VCAM-1 et ICAM) (Plow, Haas et al. 2000; Hynes 2002), une région transmembranaire et une région intracytoplasmique courte qui interagit avec les protéines du cytosquelette grâce à des molécules adaptatrices cytoplasmiques, à l'exception de la sous-unité β_4 (Hynes 2002).

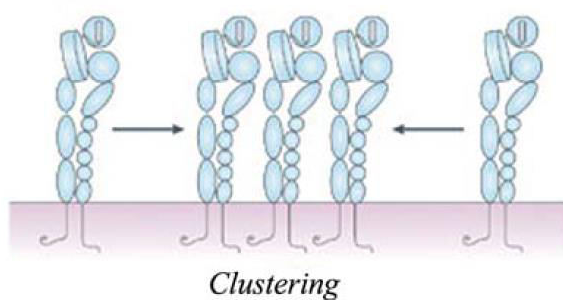
2. Structure des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires de type I qui se composent d'une région extracellulaire possédant une partie globulaire N-terminale et deux parties C-terminales ancrées dans la membrane cytoplasmique (**Fig. 10-C**) (Kinashi 2005). Les domaines C-terminaux ont une structure flexible dite « genou » qui facilite la réorganisation spatiale de la structure de l'intégrine afin d'avoir une meilleure affinité avec son ligand et de pouvoir la réguler.

A- Régulation de l'affinité



B- Régulation de la valence



C- Structure des intégrines à domaine Iα

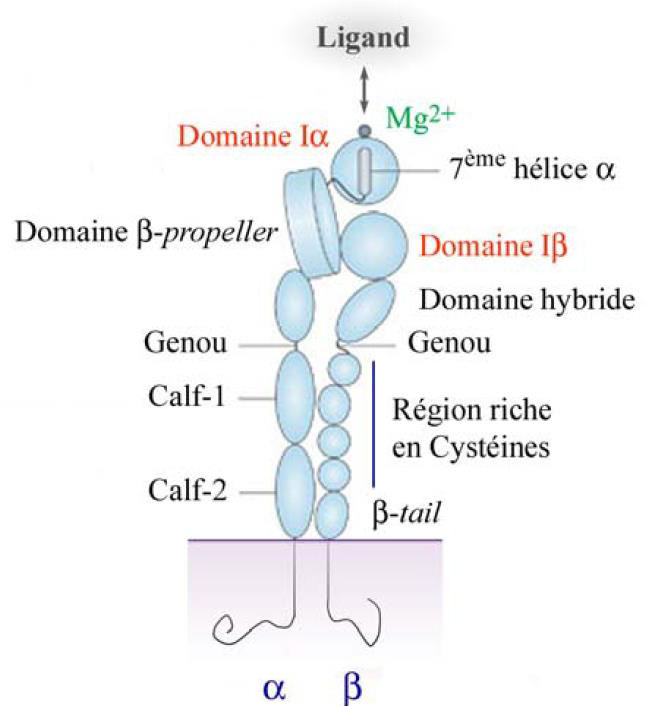


Figure 10. Structure et régulation de l'affinité des intégrines. (A) Les intégrines peuvent avoir différentes conformations spatiales : 1) une conformation pliée qui représente un état de faible affinité pour le ligand. 2 et 3) et deux conformations étendues représentant des états d'affinité moyenne et de grande affinité. (B) La modulation de la valence et de l'affinité des intégrines est un processus synchronisé au *clustering* des intégrines à la surface cellulaire. (C) Les intégrines possèdent deux domaines Iα et un domaine Iβ. Le domaine Iα a un rôle dans la liaison avec le ligand par l'intermédiaire du domaine MIDAS qui le compose. Le domaine β-propeller est lié à la septième hélice α du domaine Iα, cette région interagit avec le domaine Iβ (un homologue du domaine Iα-like). En effet, lors de l'activation des intégrines, cette région tracte l'hélice α, ce qui engendre une modification conformationnelle du domaine MIDAS et la transition de l'intégrine dans une phase de haute affinité pour son ligand (d'après (Kinashi 2005)).

La région globulaire de l'hétérodimère est impliquée dans l'adhérence grâce à un ou deux domaines I (*inserted domain*), qui sont aussi appelés domaines A (Lee, Rieu et al. 1995). Ce domaine composé de 200 acides aminés, et qui est similaire au facteur Von Willebrand de type A (Larson, Corbi et al. 1989), est présent dans la moitié des sous-unités α (domaine Iα) et il est ancré dans la séquence primaire du domaine «β-propeller». Ce domaine I possède un site conservé nommé MIDAS (*Metal-ion-dependent adhesion site*) qui permet la liaison d'un cation divalent, Mg^{2+} ou Ca^{2+} , et qui joue un rôle essentiel dans la fixation du ligand. En effet,

le changement de la structure 3D de l'intégrine lors de la fixation du ligand au domaine I de la sous-unité α est dû à la libération de l'ion métallique. De même sur la sous-unité β , il y a une structure homologue qui est le domaine I β porteur aussi d'un site MIDAS. Ce domaine est impliqué, si uniquement la sous-unité α associée ne contient pas de domaine I α (comme les intégrines plaquettaires $\alpha_{IIb}\beta_3$), dans l'interaction de l'intégrine avec son ligand. Dans le cas contraire, comme dans le cas des intégrines leucocytaires qui possèdent un domaine I α , l'interaction avec le ligand se fait par le biais de ce dernier et le domaine I β joue un rôle de modulateur de son homologue.

Le domaine intracellulaire est composé de 50 acides aminés (sauf dans le cas de la sous-unité β_4 qui contient plus de 1000 acides aminés) et joue un rôle primordial dans la modulation de l'activité des intégrines. La séquence protéique du domaine intracytoplasmique ne partage qu'une faible homologie au niveau des sous-unités α mis à part la séquence proximale conservée GFFKR, ce qui signifie que chaque chaîne α a un rôle bien précis. En revanche, il y a toujours une homologie de séquence au niveau des différentes sous-unités β . Néanmoins, l'homologie de séquence est fortement conservée entre les différentes espèces pour les sous-unités α , ce qui suggère l'importance des domaines cytoplasmiques dans les processus où les intégrines sont impliquées. La séquence proximale conservée GFFKR joue un rôle important dans l'association non covalente de la chaîne α avec la chaîne β en se liant avec certains acides aminés localisés dans le domaine conservé HDR(R/K)E de la partie intracytoplasmique de la sous-unité β , formant une liaison saline entre l'arginine de la sous-unité α et l'acide aspartique de la sous-unité β (Vinogradova, Haas et al. 2000; Adair and Yeager 2002).

L'intégrine reste dans un état inactif lorsque les domaines intracytoplasmiques α et β sont liés. Il a été montré, grâce à une étude, utilisant la technologie FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), que les domaines intracellulaires des chaînes α_L et β_2 se séparent lorsque l'intégrine LFA-1 s'engage dans la reconnaissance de son ligand ou pendant une activation par la signalisation « *inside-out* », ce qui révèle l'existence d'un mécanisme bien défini lors de la transmission du signal *via* la membrane plasmique (Kim, Carman et al. 2003). De plus, l'ensemble des sous-unités β possèdent deux motifs intracellulaires NPXY/F qui leur permettent d'interagir avec de nombreuses protéines de signalisation. Il a été montré que le domaine intracytoplasmique β (Legate and Fassler 2009) peut se lier à différentes protéines comme par exemple la Taline ou la Kindline (Calderwood, Fujioka et al. 2003). En effet, ces deux protéines agissent en synergie en activant l'intégrine lors de la liaison avec son domaine intracytoplasmique β (Tadokoro, Shattil et al. 2003; Senetar, Moncman et al. 2007 ; Larjava,

Plow et al. 2008), alors que les protéines Filamine et Dok1 diminuent cette activation (Kiema, Lad et al. 2006 ; Oxley, Anthis et al. 2008). Il a été observé que la protéine Migfiline module l'activation des intégrines par le blocage de l'interaction de l'intégrine avec la Filamine (Ithychanda, Das et al. 2009). De plus, l'activation des intégrines peut être modulée par les protéines ILK et FAK (*Focal Adhesion Kinase*) à travers une signalisation de type *inside-out*, alors qu'en temps normal, elles sont impliquées dans les voies de signalisation de type *outside-in* (Honda, Shirotani-Ikejima et al. 2009 ; Michael, Dumbauld et al. 2009). Enfin, comme ce sont les chaînes β des intégrines qui sont liées aux protéines du cytosquelette, ceci suggère fortement que ce sont elles qui activent les différentes voies de signalisation et non pas la chaîne α .

3. Signalisation « *Inside-out* » et « *Outside-in* »

La signalisation bidirectionnelle est une des particularités des intégrines. En effet, elles sont impliquées dans l'intégration des informations de la MEC et les traduisent en signaux intracellulaires *via* la formation de contacts focaux correspondant à la signalisation « *outside-in* ». Dans le sens inverse, la liaison de molécules sur leurs domaines cytoplasmiques modifie l'activation et l'état d'affinité des intégrines pour leurs ligands, modifiant ainsi leurs propriétés adhésives aboutissant à la signalisation « *inside-out* ». La signalisation « *inside-out* » se décrit par l'ensemble des événements qui induisent des changements conformationnels entraînant une augmentation de l'affinité des intégrines pour leurs ligands et leur *clustering* à la membrane, et qui résultent en la régulation de l'avidité nécessaire à l'adhérence cellulaire. Au cours de la signalisation « *inside-out* », les voies de signalisation activées par les cytokines, les facteurs de croissance ou encore par l'activation du TCR dans les lymphocytes T, contrôlent l'activation et l'affinité des intégrines pour leur ligand en régulant la liaison de certains partenaires cytoplasmiques. Les cellules du sang circulant maintiennent généralement leurs intégrines dans un état inactif caractérisé par une conformation pliée des ectodomains qui restreint leur capacité à lier leurs ligands. Lors de leur entrée dans les tissus lymphoïdes, l'activation transitoire des intégrines par les chimiokines permet aux lymphocytes T de scanner les CPA à la recherche d'Ag au cours d'interactions brèves. Suite à la reconnaissance spécifique, l'engagement du TCR par les complexes CMH-peptide induit également une signalisation « *inside-out* » permettant l'activation complète des intégrines, laquelle participe à la formation de conjugués stables entre la CPA et le lymphocyte T. Le but de cette signalisation « *inside-out* » consiste à activer

les intégrines en séparant leurs sous-unités α et β , aboutissant ainsi à la transition vers un état de haute affinité pour leur ligand.

4. Activation des intégrines : changement de conformation spatiale

Afin que les intégrines puissent jouer leur rôle dans le microenvironnement tissulaire, elles doivent être activées *via* la reconnaissance et la fixation de leurs ligands. La régulation de l'interaction avec le ligand se déroule d'une part, grâce aux transformations conformationnelles de l'intégrine lui permettant d'accroître son affinité pour son ligand et d'autre part, grâce aux modifications de mobilité membranaire latérale aboutissant au *clustering* de l'intégrine. Il a été démontré que les intégrines peuvent avoir trois conformations différentes qui sont associées à des niveaux d'affinité bien définis (Takagi, Petre et al. 2002; Shimaoka, Xiao et al. 2003 ; Luo and Springer 2006). Comme lors de l'activation de l'intégrine ou de sa liaison avec son ligand, elle passe alors d'un état fermé (de repos) à un état ouvert (actif) (Lee, Rieu et al. 1995 ; Liddington and Ginsberg 2002). L'intégrine dite dans un état de faible affinité, acquière une conformation spatiale pliée, l'extrémité du domaine extracellulaire peut se rapprocher d'environ 5 nm de la surface cellulaire. En revanche, les intégrines dites dans un état d'affinité moyen ou en état de haute affinité envers leur ligand, ont une conformation spatiale plus étirée ou étendue, leur extrémité peut se trouver à environ 20 nm de la surface cellulaire (**Fig. 10-A/B**). Les niveaux d'affinités des intégrines: faibles, intermédiaires et hautes, sont symbolisés respectivement par une constante de dissociation de 1 mM, 10 μ M et 100 nM. Il n'y a que les affinités hautes qui permettent une interaction stable même si les intégrines de conformation intermédiaires interagissent fortement avec leur ligand.

L'avidité est le processus qui permet d'accroître la liaison d'adhésion de l'intégrine à son ligand par l'oligomérisation de plusieurs intégrines, appelée communément le *clustering* des intégrines. En effet, lors de la fixation des ligands sur les intégrines, ces dernières se rassemblent à un endroit de la membrane, un état qui leur permet d'accroître l'avidité envers leur ligand. Ce processus d'avidité est assuré par l'activation de signaux de type *outside-in* (fixation de ligand) ou de signaux de type *inside-out*, entraînant une réorganisation du cytosquelette d'actine et un recrutement de protéines adaptatrices. Une étude a montré que l'intégrine LFA-1 forme un *cluster* à la membrane des cellules T suite à l'activation du TCR (Stewart, McDowall et al. 1998). Les modifications conformationnelles des intégrines sont régulées par les domaines intracellulaires des chaînes α et β . En effet, l'acide aminé arginine

et l'acide aspartique présents respectivement, dans le motif GFFKR du domaine cytoplasmique de la chaîne α et dans le motif conservé HDR(R/K)E de la chaîne β , forment une liaison saline qui juxtapose les deux domaines cytoplasmiques α et β conférant à l'intégrine une conformation cytoplasmique associée à une faible activité de l'intégrine.

5. Caractéristiques et structure de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$

L'intégrine $\alpha_E\beta_7$ (HML-1, *Human Mucosal Lymphocyte-1*) est un hétérodimère formé de la chaîne α_E (aussi nommée CD103) et de la chaîne β_7 . Elle est exprimée essentiellement par les LT se trouvant dans la muqueuse intestinale (Cerf-Bensussan, Jarry et al. 1987 ; Kilshaw and Baker 1988). Le domaine extracellulaire de la sous-unité α_E est formé d'une chaîne légère (25 kDa) et d'une chaîne lourde (150 kDa) reliés par une liaison disulfure qui est le résultat du clivage post-traductionnel de la chaîne α_E (Parker, Cepek et al. 1992). De plus, la sous-unité α_E possède un domaine I où se trouve un domaine MIDAS qui est essentiel pour la reconnaissance du ligand. Le seul ligand connu à ce jour de l'intégrine CD103 est la E-cadhérine (CD326), le marqueur spécifique des cellules épithéliales. La liaison formée entre CD103 et son ligand E-cadhérine est impliquée dans la rétention des LT au sein des tissus épithéliaux (Cepek, Shaw et al. 1994 ; Karecla, Bowden et al. 1995; Higgins, Mandlebrot et al. 1998) (**Fig. 11**).

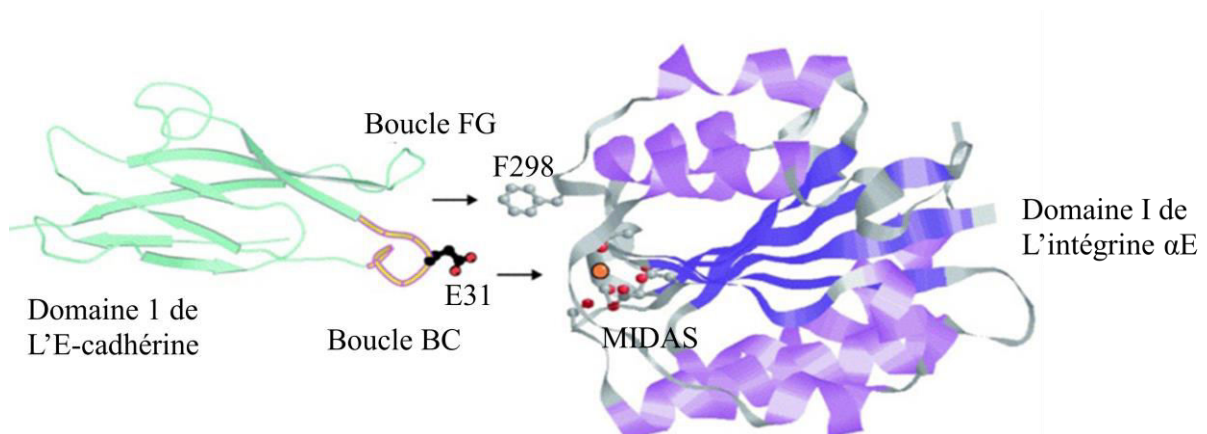


Figure 11 : Modèle de l'interaction entre l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$ et la E-cadhérine. L'intégrine $\alpha_E\beta_7$ (appelée aussi CD103 au nom de sa chaîne α_E) interagit avec son ligand grâce à son domaine MIDAS situé au niveau du domaine I α qui se lie au résidu E31 situé sur la boucle BC de la E-cadhérine. Il est suggéré aussi que le résidu F298 de l'intégrine α_E interagit avec la boucle FG (d'après (Agace, Higgins et al. 2000)).

Il a été suggéré que d'autres ligands exprimés par les cellules de l'épiderme peuvent se lier à CD103, cependant ils n'ont pas encore été identifiés à ce jour (Brown, Furness et al. 1999). De plus, une étude fondée sur l'utilisation des kératinocytes de la peau, a suggéré l'existence d'un autre ligand de CD103 qui est capable d'interagir avec le domaine MIDAS de l'intégrine (Jenkinson, Whawell et al. 2011).

Il est bien connu que chaque intégrine a une structure moléculaire bien précise et une localisation tissulaire bien définie ce qui engendre une reconnaissance spécifique d'un seul ligand. De ce fait, le couple « CD103/E-cadhérine » a un rôle bien défini dans la fonction immunitaire. L'E-cadhérine est une glycoprotéine appartenant à la famille des molécules d'adhérence. Leur fonctionnement dépend des ions calcium (Ca^{2+}), d'où leur nom (Geiger and Ayalon 1992 ; Grunwald 1993). La E-cadherine a un rôle essentiel dans la formation des jonctions intercellulaires au niveau de MEC et elle est importante pour le maintien et à la cohésion des tissus épithéliaux (McNeill, Ozawa et al. 1990). En plus, l'expression de l'E-cadherine est considérée comme un marqueur antitumoral car sa perte d'expression est observée lors de la formation de tumeurs métastatiques de type épithéliale. L'E-cadherine possède un domaine structural de type Ig similaire aux domaines « Ig-like » des membres de la superfamille des Ig (Nagar, Overduin et al. 1996). Il a été montré par mutagenèse dirigée, dans des modèles de lignées murines, et humaines, que le glutamate en position 31 est essentiel pour la liaison de la E-cadhérine à l'intégrine CD103 au niveau de son motif MIDAS (Karecla, Bowden et al. 1995) (Taraszka, Higgins et al. 2000). De plus, grâce à la même technique, il a été montré que la mutation du résidu phénylalanine en position 298 du domaine A de la chaîne α_E (proche du domaine MIDAS), induit la perte de l'interaction avec la E-cadhérine (Higgins, Cernadas et al. 2000).

6. Distribution de l'intégrine $\alpha_E(\text{CD103})\beta_7$

6.1. Expression de CD103 dans les lymphocytes T CD4^+ et T CD8^+

L'intégrine CD103 a été décrite pour la première fois sur les cellules T infiltrant la muqueuse intestinale. Elle est exprimée sur environ 90% des LT CD8^+ et 40-50% des LT CD4^+ (Cerf-Bensussan, Jarry et al. 1987) (Kilshaw and Murant 1990) (Russell, Parker et al. 1994). De plus, elle est exprimée sur les lymphocytes des tissus épithéliaux pulmonaires (Erle, Brown et al. 1994) (Lohmeyer, Friedrich et al. 1999), sur les lymphocytes du tractus uro-génital (Christmas, Brew et al. 1993 ; Pudney and Anderson 1995) et au sein d'inflammation épidermique ou de lymphomes T cutanés (Sperling and Wortis 1989; Simonitsch, Volc-

Platzer et al. 1994 ; Dietz, Whitaker-Menezes et al. 1996 ; de Vries, Langeveld-Wildschut et al. 1997). CD103 joue un rôle important dans la rétention des IEL (*Intestinal intraepithelial lymphocyte*) dans l'intestin, car dans les souris déficientes pour la sous-unité α_E , le nombre d'IEL intestinaux est diminué (Schon, Arya et al. 1999). Par ailleurs, dans un modèle des souris déficientes pour l'IL-2, l'utilisation d'Ac monoclonaux (Acm) anti CD103 bloque l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale (Ludviksson, Strober et al. 1999). CD103 est exprimée uniquement par une sous-population minoritaire de PBL (environ 3%), d'où l'hypothèse selon laquelle l'induction de CD103 dans les LT CD8⁺ ait lieu *in situ* à leur entrée dans les tissus épithéliaux (Cerf-Bensussan, Jarry et al. 1987). De manière contradictoire, des résultats ont montré que CD103 n'est pas essentielle pour le maintien des LT CD8⁺ effecteurs/mémoires spécifiques de l'Ag dans les tissus épithéliaux, ce qui suggère que d'autres facteurs peuvent intervenir (Lefrancois, Parker et al. 1999).

6.2. Expression de CD103 dans les DC

CD103 peut être exprimée aussi par une sous-population de DC CD11b⁺ au niveau de la *lamina propria* et des plaques de Peyer (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009). Dans les ganglions mésentériques, des DC CD103⁺ issus de la *lamina propria*, sont impliquées dans l'induction du récepteur de chimiokine CCR9 et de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ sur les LT CD8⁺ activés. Ces derniers migrent vers la muqueuse intestinale pour exercer leurs fonctions effectrices (Annacker, Coombes et al. 2005) (Johansson-Lindbom, Svensson et al. 2005). De plus, les DC CD103⁺ sont impliquées dans l'induction de CCR9 à la surface des LT CD4⁺, et dans la différenciation de LT naïfs en cellules Treg Foxp3⁺ par un processus impliquant le TGF- β et l'acide rétinoïque (Annacker, Coombes et al. 2005) (Coombes, Siddiqui et al. 2007). De manière intéressante, seules les DC CD103⁺ venant des ganglions mésentériques sont impliquées dans la différenciation des cellules Treg, contrairement aux DC CD103⁻ (del Rio, Bernhardt et al. 2010). En plus du TGF- β et de l'acide rétinoïque, il a été montré que la molécule IDO intervient dans la différenciation des Treg par les DC CD103⁺. Ainsi, la perte d'expression d'IDO favorise une différenciation des cellules T en Th1 et Th17 à la fois *in vitro* et *in vivo* (Matteoli, Mazzini et al. 2010). Cependant, dans un modèle murin, les DC CD103⁺ issus des ganglions mésentériques ne sont pas toujours programmées pour induire les Treg Foxp3⁺ (Anita Chhabra 2013). En conclusion, le rôle des DC CD103⁺ varie en fonction des conditions environnementales (Laffont, Siddiqui et al. 2010). Dans l'intestin grêle, il a été montré qu'une sous-population de DC CD103⁺CD8 α ⁺ a un rôle dans l'induction de la réponse Th1 et une réponse cytotoxique (Fujimoto, Karuppuachamy et al. 2011).

6.3. Expression de CD103 dans les cellules Treg

Dans les mécanismes de tolérance périphérique, les cellules Treg sont considérées comme étant les principaux médiateurs dans le contrôle de l'inflammation et de prévention des maladies auto-immunes (Mills 2004). Les Treg peuvent exprimer l'intégrine CD103 à leur surface et une étude a montré que CD103 est un biomarqueur d'une certaine sous-population de cellules Treg CD4⁺/CD25⁺ et CD4⁺/CD25⁻. Cette dernière est sous-population qui dispose d'une petite capacité de suppression (Lehmann, Huehn et al. 2002). Il a été suggéré que CD103 a un rôle important dans la migration des LTreg CD4⁺ des organes lymphoïdes vers les tissus épithéliaux. Toutefois, CD103 n'a pas de rôle direct dans l'activité régulatrice de ces cellules. Il a été montré aussi que la migration des cellules Treg CD4⁺/CD103⁺/FoxP3⁺/CCR5⁺ au niveau des sites inflammatoires, retarde le développement de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) en réduisant la prolifération des lymphocytes T et B du donneur et en entraînant la mort de ces derniers par apoptose (Zhao, Zhang et al. 2008). De plus, il a été montré que la population de cellules Treg CD8⁺/FoxP3⁺/CD103⁺ ont des capacités immunosuppressives *via* la sécrétion d'IL-10 et du TGF- β (Liu, Lan et al. 2014).

7. Fonctions de l'intégrine α_E (CD103) β_7

7.1. Rôle de CD103 dans l'adhérence et la rétention des lymphocytes T

Comme décrit précédemment, l'interaction de CD103 avec son ligand la E-cadhérine est essentielle pour l'adhérence des LT aux tissus épithéliaux. De plus, il a été observé, dans différentes pathologies, que CD103 joue un rôle clé dans le processus de rétention des LT dans l'épithélium intestinal et dans l'épiderme (Agace, Higgins et al. 2000 ; El-Asady, Yuan et al. 2005 ; Suffia, Reckling et al. 2005) . Au niveau des IEL, CD103 permet leur migration et leur rétention dans les tissus épithéliaux et son expression accroît leur activation (Cerf-Bensussan, Jarry et al. 1987 ; Schieferdecker, Ullrich et al. 1990; Cepek, Parker et al. 1993). Ainsi, grâce au couple « CD103/E-cadhérine », les IEL sont maintenus dans les épithéliaux. Ces cellules sont bien placées comme premier rempart en cas d'infection virale. En effet, les IEL sont considérés comme des agents de maintien de l'immunosurveillance (Kilshaw and Karecla 1997). Le défaut d'adhérence des IEL est formellement lié à la perte d'expression de E-cadhérine par les cellules épithéliales, entraînant un échec de la réponse immunitaire locale.

CD103 peut transmettre des signaux « *outside-in* » permettant de contrôler différents processus comme la croissance cellulaire. En effet, il a été montré que le couple CD103/E-

cadhérine est directement impliqué dans la prolifération des lymphocytes T. Une étude a montré, dans le thymus, que les cellules épithéliales thymiques induisent la prolifération des thymocytes CD8⁺ exprimant l'intégrine CD103 de manière dépendante de son ligand (Kutlesa, Wessels et al. 2002). Bien que la migration et la morphologie des lymphocytes intraépithéliaux sont des éléments importants dans la régulation des fonctions lymphocytaires, les mécanismes impliqués dans ces processus étaient jusqu'à lors inconnus. Une étude a rapporté que l'intégrine $\alpha_E(CD103)\beta_7$ a un rôle essentiel dans la régulation de la mobilité et de la morphologie des cellules T $\gamma\delta$ dendritiques de l'épiderme (DETC) (Schlickum, Sennefelder et al. 2008). En plus, les DETC exprimant CD103 forment des protrusions et adoptent un profil migratoire de type amiboïde. CD103 est impliquée également dans la régulation de la morphogenèse intraépithéliale de certains leucocytes (Schlickum, Sennefelder et al. 2008). Au travers ces études, cette intégrine ne semble donc pas seulement être impliquée dans l'adhérence des lymphocytes T aux cellules épithéliales, mais également dans la régulation de leurs fonctions.

7.2. Rôle de CD103 dans la cytotoxicité induite par les CTL

Le couple CD103/E-cadherine est important dans les réponses lymphocytaires au niveau des tissus épithéliaux en conditions pathologiques. En effet, en plus de son rôle dans la rétention des lymphocytes au sein des tissus épithéliaux, CD103 semble être nécessaire à la lyse des cellules épithéliales par les lymphocytes T CD8⁺. Les travaux de Taunk et ses collaborateurs ont montré que CD103, exprimée par les IEL, a un rôle important dans la lyse des cellules tumorales d'origine épithéliale (Taunk, Roberts et al. 1992). De plus, les LT CD8⁺/CD103⁺ résidants peuvent induire la mort des cellules cancéreuses du pancréas (French, Cresswell et al. 2002).

Plus récemment, mon équipe a démontré que la liaison de l'intégrine CD103 avec la E-cadherine, exprimée à la surface des cellules tumorales épithéliales, est importante pour la maturation de la SI cytotoxique aboutissant à la polarisation et l'exocytose des granules cytotoxiques nécessaires à la destruction des cellules cancéreuses (Le Flo'h, Jalil et al. 2007). En plus de son rôle dans l'adhérence des LT aux cellules tumorales d'origine épithéliale, CD103 est impliquée dans l'induction d'un signal de costimulation qui coopère avec le signal TCR afin de promouvoir l'activation des LT CD8⁺ (Le Flo'h, Jalil et al. 2007). Il a été décrit qu'une sous-population CD8⁺/CD103⁺ allogénique a la capacité de déclencher la lyse des tissus intestinaux (réaction du greffon contre l'hôte, GvHD) (El-Asady, Yuan et al. 2005) et

le rejet d'allogreffes rénales humaines. De plus, des études ont montré que les CTL CD8⁺/CD103⁺ sont fréquents dans les tubulites (Hadley, Charandee et al. 2001 ; Robertson, Wong et al. 2001). De même, la population effectrice T CD8⁺CD103⁺ a un rôle important dans l'élimination et le rejet des allogreffes épithéliales (Hadley, 2004; Smyth et al., 2007; Yuan et al., 2005). Ainsi, ces effecteurs CD8⁺CD103⁺ sont plus nombreux pendant la phase chronique du rejet d'allogreffes (Hadley et al., 2001). Par ailleurs, les souris déficientes pour CD103 tolèrent mieux les allogreffes pancréatiques, ce qui montre que l'expression de cette intégrine soit importante pour leur élimination par les lymphocytes T CD8⁺ (Feng, Wang et al. 2002).

Dans ce contexte, l'expression de CD103 est cruciale pour l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ à l'encontre des cellules tumorales. D'autres travaux ont montré que la perte d'expression de CD103 prévient la réaction du greffon contre l'hôte tout en préservant l'activité antitumorale des LT CD8⁺ (Liu, Anthony et al. 2011). L'équipe de Woodberry a montré, dans la muqueuse de la langue, que les CTL CD8⁺ spécifiques de l'EBV expriment fortement CD103 et sont de phénotype effecteurs mémoires. Cette population contribue directement à la réponse antivirale (Woodberry, Suscovich et al. 2005). De plus, les LT CD8⁺/CD103⁺, demeurant dans l'épithélium pulmonaire, protègent les poumons des infections virales respiratoires, comme la grippe (Piet, de Bree et al. 2011).

8. Signalisation « *Outside-in* » et « *Inside-out* » de CD103

La régulation de l'affinité de CD103 pour son ligand est identique à la plupart des intégrines et elle est assurée par des signaux de type « *Outside-In* » induits par l'engagement du TCR ou des récepteurs de chimiokines. En effet, l'engagement du TCR, de manière expérimentale grâce à la PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) qui active la voie de signalisation du TCR, permet l'expression de CD103 par les IEL et de l'augmentation de son avidité vis-à-vis de son ligand (Higgins, Mandlebrot et al. 1998). De même, des études ont démontré le rôle des chimiokines dans la régulation de l'affinité de l'intégrine envers la E-cadherine. En effet, l'adhérence des cellules T CD8⁺ *via* la liaison CD103/E-cadhérine est augmentée suite à l'interaction de la chimiokine CCL25, sécrétée par les cellules de l'épithélium intestinal, avec son récepteur CCR9 exprimé à la surface des IEL (Ericsson, Svensson et al. 2004). De la même manière, la chimiokine inflammatoire CCL7 sécrétée par les cellules rénales, induit l'activation de CD103 lors des rejets de greffe (Al-Hamidi, Pekalski et al. 2008).

En ce qui concerne la signalisation « *Inside-Out* », des protéines interagissant avec les domaines cytoplasmiques des sous-unités α_E et β_7 , telles que la protéine WD WAIT-1 (*WD protein associated with integrin tails*) et la Filamine ont été identifiées, suggérant leur rôle dans la signalisation de l'intégrine (Pfaff, Liu et al. 1998; Rietzler, Bittner et al. 1998). Aussi, des protéines adaptatrices, comme la Dab1, Dok1, la Taline et la Tensine, pouvant se lier au domaine intracellulaire de la sous-unité β_7 ont été décrites (Calderwood, Fujioka et al. 2003). Toutefois, on ne connaît pas encore leur mode de fonctionnement dans la signalisation de l'intégrine. En plus du rôle de CD103 dans l'adhérence cellulaire, des études suggèrent que CD103 peut être aussi impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et l'activité cytotoxique *via* des signaux « *outside-in* » (Kutlesa, Wessels et al. 2002). Par ailleurs, la liaison Ac spécifiques à CD103 induit l'expansion clonale des cellules T et la destruction des lignées cibles (Sarnacki, Begue et al. 1992; Lefrancois, Barrett et al. 1994; Russell, Parker et al. 1994). Enfin, comme l'intégrine LFA-1, CD103 possède des fonctions de co-stimulation du signal TCR (Sillett, Southgate et al. 1999).

Dans ce contexte, mon équipe a montré que l'activation CD103 avec une molécule recombinante E-cadhérine-Fc est suffisante pour induire la relocalisation des granules cytotoxiques à la zone de contact. En revanche, l'engagement du TCR est nécessaire pour l'exocytose de ces granules. De plus, une phosphorylation de la kinase ERK1/2 et de la PLC- γ 1 nécessite seulement l'engagement de CD103. Le blocage de la PLC- γ 1 inhibe la polarisation des granules, entraînant l'arrêt de l'activité cytotoxicité des CTL. Ces travaux montrent le rôle de CD103 comme molécule de la signalisation dans l'activation des CTL antitumoraux (Le Floc'h, Jalil et al. 2011).

Chapitre III

III. LES CHECKPOINTS DE LA REPONSE IMMUNITAIRE

Plusieurs travaux se sont intéressés aux molécules de costimulation telle que CD28 (B7) qui jouent un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire et dans le maintien de la tolérance aux Ag du soi (Ceeraz, Nowak et al. 2013). Ces molécules fournissent le deuxième signal nécessaire à l'activation des LT suite à l'engagement du TCR qui reconnaît l'Ag présenté par le CMH sur les APC. L'absence de costimulation induit l'anergie lymphocytaire (Boussiotis, Freeman et al. 1993; Jenkins 1994 ; Perez, Van Parijs et al. 1997). Ce deuxième signal peut impliquer une molécule coinhibitrice appartenant à la famille des protéines B7 ou le TNF qui sont exprimées par les APC et sur les LT (**Fig. 12**). En outre, ces molécules de costimulation ou d'inhibition induisent des signaux directionnels qui jouent un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire et de la prévention contre l'auto-immunité. Ces molécules ont une homologie de structure (IgV-IgC)composées d'une région Ig variable (IgV) et d'une région Ig constante (IgC), telles que PD-L1, PD-L2, ICOS-L et CD80, CD86. Cependant, seul la molécule B7-H3 a une structure spécifique composée IgV-IgC-IgV-IgC (Sharpe and Freeman 2002).

Ces récepteurs sont regroupés sous la dénomination: superfamille Ig B7. La famille CD28 se compose des molécules suivantes : CD28, CTLA-4, ICOS (*Inducible T-cell COStimulator*), PD-1, et BTLA (B and T lymphocyte attenuator). CD28 et ICOS sont des récepteurs de costimulation, alors que CTLA-4, PD-1, et BTLA sont des molécules de co-inhibition. L'importance de la régulation de ces voies a été mise en évidence grâce à l'utilisation de l'Ac anti-CTLA-4 (Ipilimumab) utilisé en essai clinique de phase III dans le mélanome (Ceeraz, Nowak et al. 2013). De plus, une amélioration de la survie (4mois) est observée chez les patients atteints de mélanome traités avec l'Ipilimumab combiné au vaccin gp100 (Hodi, O'Day et al. 2010). La capacité à bloquer ces différentes voies de signalisation grâce à ces points de contrôle a conduit à l'utilisation de ces récepteurs inhibiteurs dans des essais cliniques en particulier les récepteurs de la famille B7 et de PD-1.

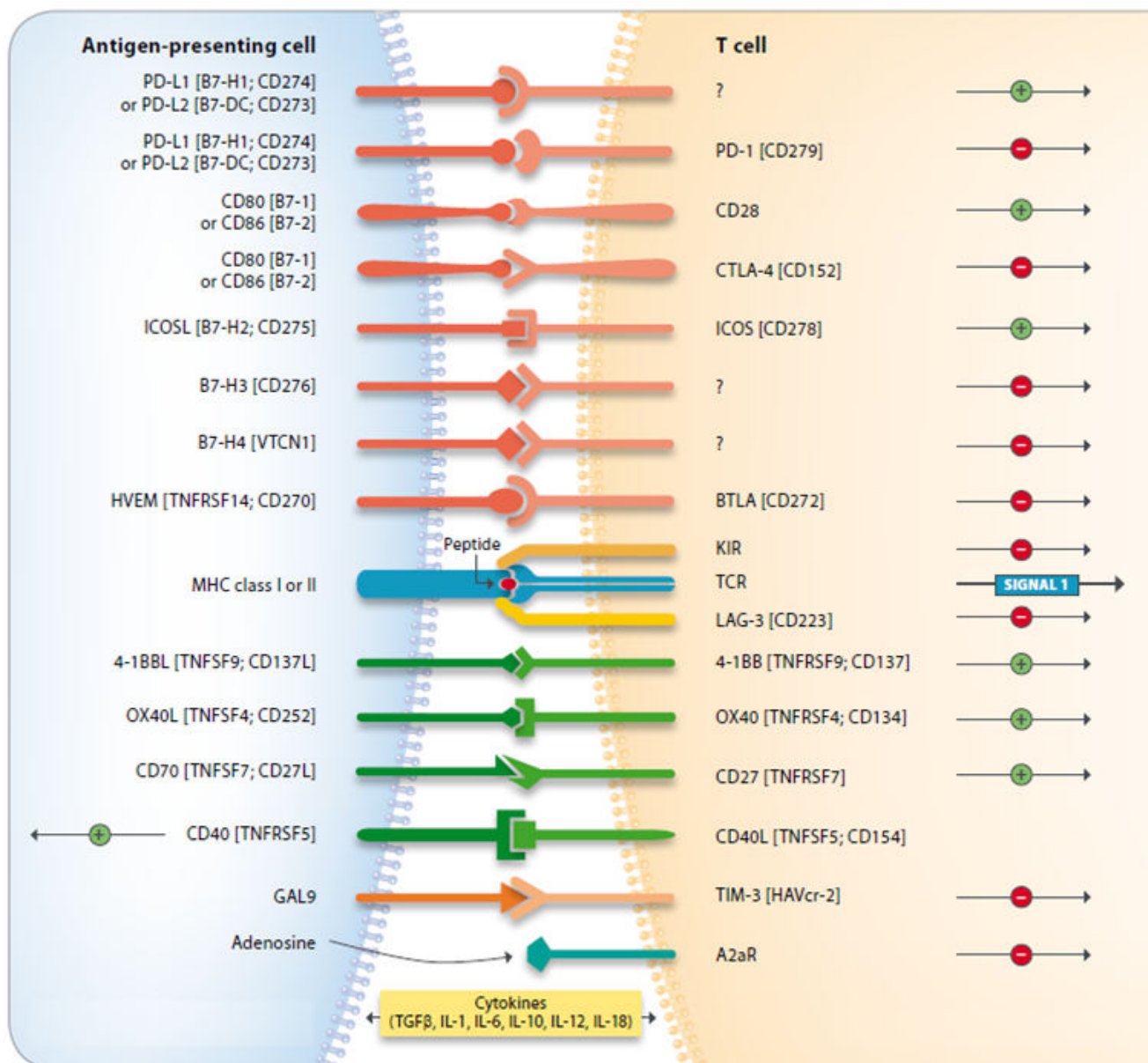


Figure 12. Les molécules checkpoint du système immunitaire. L'activation des LT nécessite deux signaux, le premier signal est assuré par le TCR suite à la reconnaissance du complexe CMH-peptide. Pour soutenir pleinement l'activation des cellules T, un deuxième signal est nécessaire et est délivré par la molécule CD28 qui se lie aux molécules de la famille des B7 comme B7-H1/B7-H2. Il existe d'autres molécules de costimulation comme ICOS. De même, il existe des molécules d'inhibition comme CTLA-4, PD-1 et BTLA. Les récepteurs pour B7-H3 et B7-H4 sont inconnus. Aussi, il existe d'autres récepteurs inhibiteurs tels que LAG-3, Tim-3, GITR et A2aR, ainsi que d'autres récepteurs activateurs de la famille des TNF comme OX40, 4-1BB (Pardoll 2012).

1. Les molécules inhibitrices

1.1. PD-1/PD-L1

PD-1 (*Programmed cell death protein-1*) a été découvert en 1992 dans un hybridome de LT où son expression a été inhibée par induction de l'apoptose dans des cellules T thymiques (Ishida, Agata et al. 1992). C'est une protéine transmembranaire de type 1 qui possède un domaine extracellulaire IgV et une partie cytoplasmique possédant un motif *ITIM* (*immunoreceptor tyrosine inhibitory motif*) et un motif *ITSM* (*Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*) (Keir, Butte et al. 2008). Elle appartient à la famille CD28 par son homologie de séquence (23%) avec CTLA-4 (Okazaki and Honjo 2006). PD-1 est exprimée sur les LT, activés mais pas sur les cellules naïves (Tseng, Otsuji et al. 2001), les lymphocytes B (Tamura, Dong et al. 2001), les monocytes (Nishimura, Okazaki et al. 2001), les DC (Tamura, Dong et al. 2001), les cellules NK et NKT.

Deux ligands de PD-1 sont actuellement connus : PD-L1/B7H1 et PD-L2/ B7H2, qui ont été identifiés grâce à une similarité avec les protéines B7 sur les bases de données biologiques (Freeman, Long et al. 2000 ; Tseng, Otsuji et al. 2001). Les deux ligands présentent des profils d'expressions distincts (Greenwald, Freeman et al. 2005). PD-L1 est exprimé par diverses cellules immunitaires et non immunitaires telles que les LT, les cellules B, les DC, les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires, du pancréas, des astrocytes et des kératinocytes (Christiansson, Soderlund et al. 2013). En revanche, l'expression de PD-L2 est beaucoup plus réduite, car son expression est inductible sur les DC, les macrophages et les cellules de moelle osseuse (Zhong, Tumang et al. 2007). L'expression de PD-L1 est également détectée sur des cellules non lymphoïdes, telles que les cellules endothéliales qui constituent l'endothélium dans le cœur, des cellules Beta des îlots pancréatiques, les cellules gliales dans les cellules du cerveau (Iwai, Terawaki et al. 2003 ; Salama, Chitnis et al. 2003) (Okazaki and Honjo 2006).

Cependant, PD-L1 peut également se lier à CD80. Cette interaction CD80/PD-L1 inhibe la prolifération des cellules T et des réponses effectrices (Butte, Keir et al. 2007; Haile, Bosch et al. 2011 ; Paterson, Brown et al. 2011) . Cette observation corrèle avec les résultats obtenus précédemment par l'équipe de Dong où ils décrivent pour la première fois la fonction de PD-L1 comme une molécule de costimulation. Leurs résultats montrent une augmentation de la prolifération des cellules T activées par la sécrétion de cytokines IL-2 dans un modèle *in vitro* de PBMC transfecté avec la protéine complète de PD-L1. De même, cette équipe a

montré dans le même modèle que PD-L1 induit la production d'IL-10, suggérant que cette molécule peut être impliquée aussi dans la modulation de la réponse immunitaire (Dong, Zhu et al. 1999). L'ensemble de ces résultats confirme que PD-L1 peut se lier à deux récepteurs (PD-1 et CD80) et en fonction de sa liaison sa fonction varie entre inhibiteur et stimulateur.

1.1.1 Voie de signalisation de PD-1

Après une stimulation antigénique, PD-1 est recruté à la SI au niveau de la cSMAC (Yokosuka, Takamatsu et al. 2012) où se trouve un complexe de protéines phosphorylées comprenant la chaîne zêta du TCR et de Zap-70 déphosphorylée. Une fois PD-1 activé, les deux tyrosines de son domaine intracellulaire vont être phosphorylées, entraînant le recrutement de SHP-1 et SHP-2 au niveau des domaines ITIM et ITSM de PD-1 (Okazaki, Maeda et al. 2001).

La fonction inhibitrice de PD-1 est perdue lorsque le motif ITSM est muté, démontrant que la tyrosine phosphorylée joue un rôle important dans la fonctionnalité de PD-1 (Xie, Lin et al. 2010). L'inhibition de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de la voie de signalisation AKT par inactivation de Zap-70 jouent un rôle dans l'homéostasie des LT *via* la signalisation de PD-1 (Parry, Chemnitz et al. 2005 ; Riley 2009 ; Fife and Pauken 2011). (**Fig. 13**).

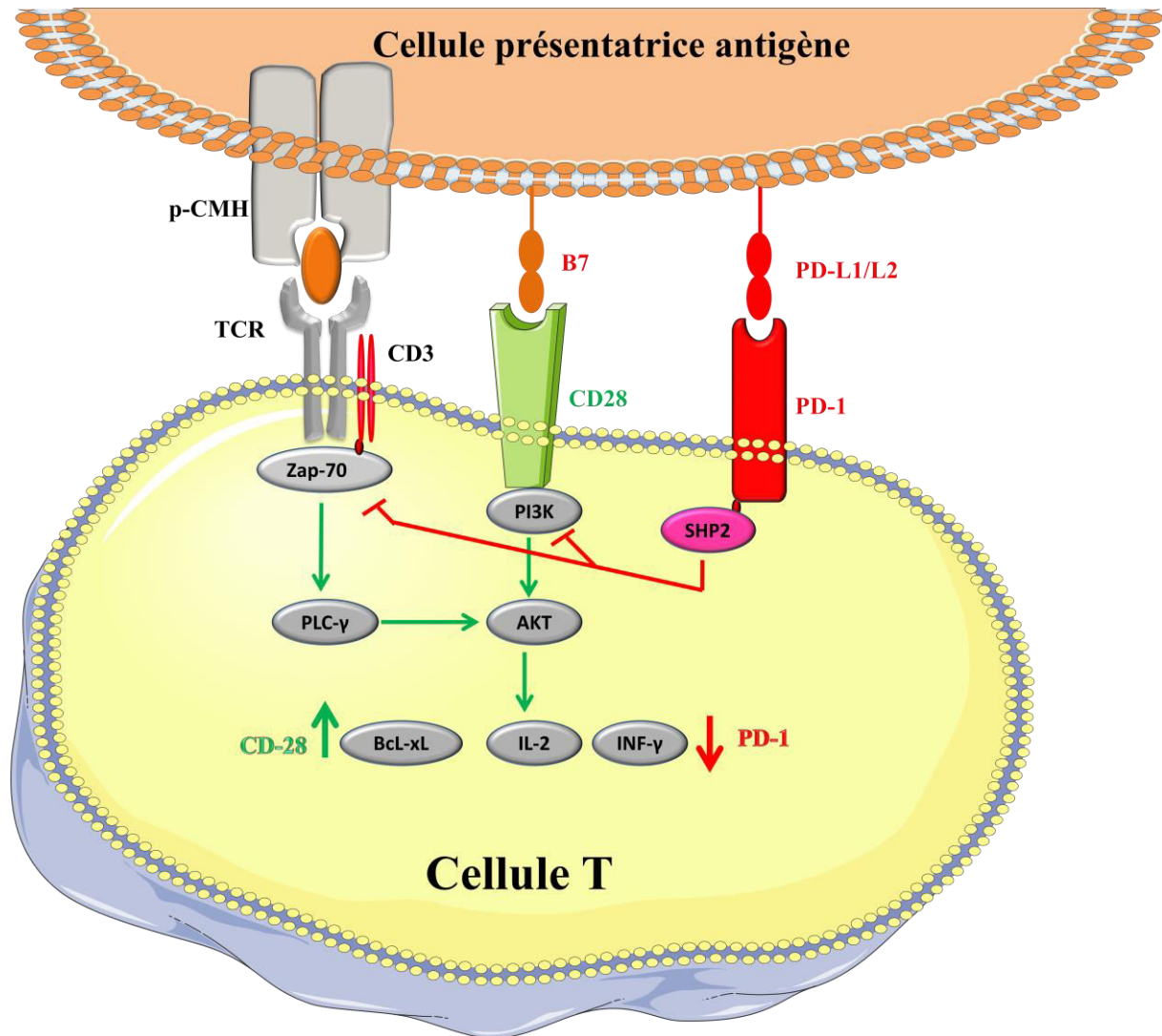


Figure 13. Voie de signalisation de PD-1. Une fois le récepteur inhibiteur PD-1 activé par liaison avec son ligand, il va se relocaliser au niveau de la synapse immunologique au côté du TCR et des molécules de costimulation telles que CD28. Ensuite, il va recruter au niveau de ces domaines ITIM et ITSM deux tyrosines phosphatase SHP-1 et SHP-2, ces dernières vont inhiber la voie d'activation de PI3K et celle du TCR en bloquant la molécule Zap-70. L'activation de PD-1 entraîne un arrêt de prolifération (IL-2), de l'activité cytotoxique (INF- γ) et une baisse de la survie (d'après (Parry, Chemnitz et al. 2005)).

1.1.2. Les souris déficientes en PD-1

Les souris au profil phénotypique PD-1^{-/-} ont fourni la preuve que PD-1 joue un rôle dans l'inhibition des LT (Nishimura, Nose et al. 1999 ; Nishimura, Okazaki et al. 2001). Ces souris développent un phénotype auto-immune, caractérisé par des titres élevés d'auto-Ac en confirmant un effet négatif sur les LT et les cellules B (Nishimura, Nose et al. 1999). Dans les souris déficientes en PD-L1, on observe une accumulation des LT CD8⁺ dans le foie, qui n'est

pas corrélé avec la maladie hépatique mais qui peut améliorer l'hépatite (Dong, Zhu et al. 2004). Dans de nombreuses maladies auto-immunes ou lors de transplantation de greffon, la voie de signalisation PD-1/PD-L1 peut avoir un effet synergique en combinaison avec les médicaments immunosuppresseurs afin d'améliorer la prise des greffons. Il a été aussi montré que les deux ligands PD-L1 et PD-L2 peuvent avoir un autre récepteur que PD-1, en mutant le site de liaison. Néanmoins, la liaison de ces ligands avec ce récepteur inconnu induit une conservation ou une augmentation de l'activité de co-stimulation (Wang, Bajorath et al. 2003). La possibilité qu'un second récepteur stimulateur non découvert existe et interagissant avec les ligands PD-L1/L2, ajouterait des similitudes avec la voie CD28/CTLA-4: CD80/86 (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Aramaki, Shirasugi et al. 2004).

1.1.3. Les différentes fonctions de PD-1

1.1.3.1. Rôle de PD-1 dans la tolérance

Chez les souris de fond génétique NOD, on observe l'apparition de premiers signes de diabète à environ 17 semaines d'âge chez les femelles. En revanche chez les souris déficientes en PD-1, le diabète apparaît plus rapidement à environ 5 semaines et avec une incidence augmentée de 30 % à 100 % (Wang, Yoshida et al. 2005). Dans le diabète, PD-1 joue un grand rôle dans la tolérance au soi et dans le contrôle des réactions auto-immunes par le maintien des cellules T en anergie (Fife, Guleria et al. 2006). PD-1 régule la tolérance au soi au niveau périphérique et central ainsi que de multiples manières dans le thymus. PD-L1 est exprimé à la surface des cellules du cortex thymique et sur les thymocytes, alors que l'expression de PD-L2 est restreinte aux cellules de la moelle thymique (Liang, Latchman et al. 2003). Tandis que PD-1 est retrouvé sur les LT CD4⁺/CD8⁻ afin de limiter la sélection positive (Nishimura, Honjo et al. 2000 ; Keir, Latchman et al. 2005). Cependant, son rôle dans la sélection négative est controversé (Blank, Brown et al. 2003 ; Thangavelu, Parkman et al. 2011). Dans un modèle de souris diabétiques qui reçoivent des cellules bêta allogéniques exprimant PD-L1 transgénique, on observe une accélération du rejet de transplantation des îlots du pancréas par l'implication de PD-L1 dans la co-stimulation (Subudhi, Zhou et al. 2004). PD-1 joue un grand rôle dans l'inhibition de la prolifération des LT autoréactifs, ce qui permet de réduire le nombre de cellules entrant en phase d'activation. De même PD-L1 et PD-L2 sont exprimés sur les DC immatures, ce qui leur permet de réguler l'activation des LT périphériques. La perte d'expression de PD-1 sur les cellules T induit un mauvais fonctionnement des DC immatures (Probst, McCoy et al. 2005). Ces données démontrent que la voie PD-1 inhibe l'auto-immunité en régulant la tolérance, tant centrale que périphérique.

Dans le système nerveux central (SNC), PD-1 est constitutivement exprimé dans les neurones de la rétine en dehors du système immunitaire et non dépendant de l'inflammation, tandis que l'expression de PD-L1 et PD-L2 sont induite par une inflammation (Chen, Pai et al. 2009). Les molécules sont présentes sur des infiltrats cellulaires des méninges dans le cas de l'EAE (Expérimental auto-immune encéphalomyélites), suggérant un rôle de PD-1 dans l'auto-immunité du SNC (Liang, Latchman et al. 2003). Il a été rapporté que PD-1 joue un rôle important dans l'EAE, cela grâce à l'utilisation d'Ac neutralisant, ce qui a conduit à une expansion précoce de l'infiltrat lymphocytaire spécifique de la MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), et en conséquent à l'aggravation de la maladie (Salama, Chitnis et al. 2003). D'autres études utilisant des souris PD-L1^{-/-} suggèrent que PD-1 et PD-L1, mais pas PD-L2, sont principalement responsables de la suppression de l'EAE (Carter, Leach et al. 2007) (Latchman, Liang et al. 2004). Les cellules T déficientes en PD-1 et PD-L1 sécrètent des quantités accrues d'IFN- γ et d'IL-17 lors de la restimulation *in vitro* et les souris KO respectives développent plus d'EAE sévère par la sécrétion de niveau haut de cytokine pro-inflammatoire telles que IFN- α , TNF, IL-6 et IL-17. En revanche, l'EAE chez la souris PD-L2 KO est comparable à des souris contrôles de type sauvages (Carter, Leach et al. 2007). Toutefois, dans une étude *in vivo* utilisant la vaccination peptidique, les résultats ont montré que les ligands PD-L1 et PD-L2 peuvent réguler de façon différentielle l'EAE en fonction du fond génétique de la souris (BALB/C, NOD, B6, B10.S et SJL/J) (Zhu, Guleria et al. 2006).

Chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP), une association avec l'expression d'un PD-1 polymorphe a été établie (Okazaki and Honjo 2007). Le SNP (G7146A) est associé à une sur-expression de PD-1, induit par l'IFN- γ sécrété par les cellules T et on le retrouve aussi chez les patients atteints de SEP (Kroner, Mehling et al. 2005). Le traitement de la SEP avec des immunomodulateurs augmente l'expression de PD-L1 sur les APC *in vitro* ainsi que dans la thérapie à base d'IFN- β (Schreiner, Mitsdoerffer et al. 2004). Ce qui suggère que l'IFN- β peut réguler la voie PD-1. En raison de son rôle reconnu dans l'inhibition de l'auto-immunité, PD-1 est devenu une nouvelle cible thérapeutique pour le développement de nouveaux traitements immunomodulateurs. Une approche utilisant un adénovirus recombinant pour exprimer PD-L1 a montré des résultats prometteurs dans un modèle d'auto-immunité (Ding, Wu et al. 2006).

Dans les cellules Treg, des études ont montré une forte expression de PD-1 et PD-L1 (Baecher-Allan, Brown et al. 2003). *In vitro*, PD-L1 induit la différenciation des LT naïfs en Treg, améliore et préserve l'expression de Foxp3 et même augmente l'activité

immunosuppressive des Treg (Francisco, Salinas et al. 2009). De même, *in vivo*, on observe une activation des Treg suite à l'expression de PD-L1 (Krupnick, Gelman et al. 2005), comme dans le SNC ou dans l'EAE (Liu, Teige et al. 2006). Le rôle de PD-1 dans l'induction des cellules Treg a été validé dans le modèle EAE montrant l'effet de la toxine pertussique de l'agent coqueluche (PT) dans l'induction de la maladie (Wang, Li et al. 2010). Des études ont montré aussi que la PT induit une perméabilisation de la membrane hémato-encéphalique et ainsi favoriser l'induction de l'EAE (Linthicum, Munoz et al. 1982) (Bruckener, el Baya et al. 2003). De plus, les études ont révélé une diminution de la quantité et de l'activité des cellules Treg lors de l'administration de PT (Chen, Winkler-Pickett et al. 2006) (Cassan, Piaggio et al. 2006). Dans les souris PD1^{-/-}, l'induction de l'EAE ne nécessite pas l'administration de PT, contrairement aux souris sauvages. De plus, ces souris montrent une diminution de la quantité des cellules Treg. En résumé, PD-1 favorise la transition phénotypique des cellules T conventionnelles en Treg, améliore leurs fonctions et contribue ainsi à limiter l'inflammation (Nicole 2012).

1.1.3.2. Rôle de PD-1 dans la réponse immunitaire antitumorale

L'expression de PD-L1/PD-L2 par un grand nombre de tumeurs murines et humaines nous a conduits à émettre l'hypothèse qu'ils peuvent avoir un rôle dans l'échappement tumoral à la surveillance immunitaire. PD-L1 est exprimé dans différentes tumeurs solides humaines : le cancer du poumon, le cancer de l'ovaire, le mélanome et le cancer colorectal. Ainsi que dans des pathologies hématologiques malignes telles que les leucémies T de l'adulte (ATLL), les lymphomes non hodgkiniens, les leucémies myéloïdes aiguës (AML), les leucémies lymphoïdes chroniques (CLL) (Dong, Strome et al. 2002 ; Kozako, Yoshimitsu et al. 2009 ; Wilcox, Feldman et al. 2009 ; Berthon, Driss et al. 2010 ; Loos, Langer et al. 2011 ; Ramsay, Clear et al. 2012). L'expression de PD-L1 a été associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (Nomi, Sho et al. 2007 ; Chen, Liu et al. 2008 ; Loos, Langer et al. 2011 ; Shi, Shi et al. 2011). Dans le cancer de l'œsophage, l'expression de PD-L1 et/ou PD-L2 est associée à un faible taux de survie (Ohigashi, Sho et al. 2005).

Un des oncogènes le plus fréquemment muté dans les CBNPC est l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Il a été montré dans un modèle de cancer du poumon murin induit par l'EGFR, une diminution du nombre de CTL corrélée à une augmentation du nombre de cellules T épuisées (Akbay, Koyama et al. 2013). L'utilisation d'Ac bloquants anti-PD-1 améliore la survie des souris atteintes d'un adénocarcinome, associé à une mutation dans

l'EGFR, et ce en augmentant l'activité effectrice des cellules T et en diminuant la sécrétion des cytokines protumorales. De plus, l'expression de PD-L1 est diminuée suite à l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR dans les CBNPC. Les cellules tumorales murines transfectées avec PD-L1 sont plus résistantes à l'activité cytotoxique des LT spécifiques *in vitro*. La tumeur acquiert la capacité à se propager plus facilement dans le microenvironnement *in vivo* avec une croissance plus accrue (Iwai, Ishida et al. 2002). Ces effets peuvent être inhibés par l'utilisation d'Ac anti-PD-L1 (Strome, Dong et al. 2003). Le carcinome mammaire 4T1 n'exprime pas PD-L1 en culture mais exprime PD-L1 *in vivo* (induit par l'IFN- γ sécrété dans le microenvironnement) (Hirano, Kaneko et al. 2005). Très peu d'études ont évalué la capacité des Ac anti-PD-1 à induire directement une réponse antitumorale. Dans le modèle du carcinome du côlon CT26, le traitement avec anti-PD-1 induit une diminution de 50% l'apparition de métastases dans le poumon après injection en intraveineux (Iwai, Terawaki et al. 2005). Cet effet a été aussi observé dans de mélanome B16 après injection au niveau de la rate où l'expression de PD-L1 est fortement élevée *in vivo*, et donc neutralisé avec un traitement anti-PD-1 qui réduit les métastases hépatiques.

Dans les essais cliniques utilisant des Ac neutralisants anti-PD-1 ou anti-PD-L1, on observe des effets positifs chez certains patients atteints de tumeurs solides ou d'hémopathies malignes (Berger, Rotem-Yehudar et al. 2008 ; Brahmer, Drake et al. 2010 ; Topalian, Hodi et al. 2012). La neutralisation des molécules PD-1 ou PD-L1 ont montré un gain de survie chez les patients atteints de mélanome métastatique, de cancers du rein, de CBNPC, et d'autres tumeurs (Brahmer, Tykodi et al. 2012) (Topalian, Hodi et al. 2012).

1.2. Tim-3/Gal-9

Membre de la superfamille des Ig, la molécule Tim-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-3*) a été identifiée à la surface des cellules Th1 murines (Monney, Sabatos et al. 2002). La famille de gènes *Tim* se compose de huit membres chez la souris (Tim-1 à -8, localisés sur le chromosome 11B1.1) et de trois membres chez l'homme (Tim-1, -3 et -4, localisés sur le chromosome 5q33.2) (Kuchroo, Meyers et al. 2006). Chacun des gènes *Tim* code pour une protéine transmembranaire de type 1 avec une structure semblable, consistant en une séquence signal suivie par un domaine IgV-like, un domaine mucine, une région transmembranaire et une queue intracytoplasmique. Les Tim-3 murine et humaine sont glycosylées et possèdent un domaine intracellulaire phosphorylé sur un résidu tyrosine (Cao,

Zang et al. 2007; Freeman, Casasnovas et al. 2010). Chez l'homme, Tim-3 est une molécule de 302 résidus présentant une homologie de séquence de 63% avec la forme murine (Monney, Sabatos et al. 2002). Elle est exprimée préférentiellement dans les CTL CD8⁺ (Khademi, Illes et al. 2004) et également les macrophages et les cellules NK. Des études ont montré que Tim-3 est exprimée constitutivement dans les DC et les monocytes dans la souris et chez l'homme (Anderson, Anderson et al. 2007).

La galectine-9 (gal-9) est le seul ligand connu à ce jour de Tim-3 (Zhu, Anderson et al. 2005 ; Cao, Zang et al. 2007), bien qu'il soit établi que Tim-3 peut également se lier à certains glucides (carbohydrate) (Wilker, Sedy et al. 2007). Gal-9 est une beta-galactoside de type lectine. Elle est composée de régions répétitives de deux domaines de reconnaissance d'hydrates de carbone qui sont reliés par des liaisons peptidiques. Gal-9 se lie à la région glycosylée de Tim-3 par son site de phosphatidylserine (Hirashima, Kashio et al. 2004) (Sabatos, Chakravarti et al. 2003). Elle est exprimée sur les cellules immunitaires et les cellules épithéliales de l'intestin (Zhu, Anderson et al. 2005). Enfin, plusieurs observations ont montré que Gal-9 est exprimée dans plusieurs tissus impliqués dans la réponse immunitaire : la rate, le thymus, les lymphocytes du sang périphérique, et dans les tissus d'origine endodermiques, c'est à dire le foie, l'intestin, l'estomac et le poumon (Chabot, Kashio et al. 2002 ; Thijssen, Hulsmans et al. 2008). En revanche, elle n'est pas exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques, dans le cerveau et les reins (Leal-Pinto, Tao et al. 1997; Tureci, Schmitt et al. 1997).

1.2.1. Les différentes fonctions de Tim-3

1.2.1.1. Rôle de Tim-3 dans les pathologies humaines

Chez les patients atteints de SEP, les cellules T CD4⁺ présents dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) expriment moins de Tim-3 que les individus sains. La diminution de l'expression de Tim-3 est accompagnée d'un niveau de production d'IFN- γ plus élevé (Koguchi, Anderson et al. 2006). En accord avec la fonction régulatrice de Tim-3 dans les cellules T chez la souris, la neutralisation de Tim-3 chez les patients sains active la sécrétion d'IFN- γ (Yang, Anderson et al. 2008). En effet, on remarque dans maladies auto-immunes telles que le psoriasis et la SEP, un défaut de régulation positive de l'expression de Tim-3 dans les cellules Th1 et Th17 par rapport à des patients atteints de dermatite atopique. Ainsi, le traitement de patients atteints de SEP avec l'IFN- β ou l'acétate glatiramere restaure la fonction de Tim-3 (Rodriguez-Manzanet, DeKruyff et al. 2009; Kanai, Satoh et al. 2012). De

plus, Tim-3 est un bon marqueur pronostique pour les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) (Liu, Shu et al. 2010). Un dysfonctionnement de l'expression de Tim-3 est associé à l'apparition systématique d'un lupus érythémateux disséminé (Wang, Meng et al. 2008). Il a été montré que le VIH induit une forte expression de Tim-3 sur les lymphocytes de type T CD8⁺. Par ailleurs, une fois que les T CD8⁺ expriment Tim-3, ces cellules ne sécrètent plus d'IFN- γ au contact de l'Ag viral. Les PBL CD8⁺/Tim-3⁺ sont incapables de se diviser, tandis qu'une division cellulaire de la population TIM-3^{-low} a été observée, ce qui suggère que Tim-3 est impliqué dans l'épuisement des LT (Rodriguez-Manzanet, DeKruyff et al. 2009). En plus, des études ont montré que le traitement des cellules avec une molécule recombinante soluble de Tim-3 avait un effet compétitif pour la reconnaissance de son ligand Gal-9, et réactiver la prolifération et la sécrétion de l'IFN- γ (Jones, Ndhlovu et al. 2008). Ces observations confirment la nature inhibitrice de Tim-3 dans la réponse immunitaire et renforcent l'idée que Tim-3 est une cible potentielle thérapeutique dans les maladies auto-immunes et infectieuses (Rodriguez-Manzanet, DeKruyff et al. 2009).

1.2.1.2. Rôle de Tim-3 dans la tolérance

L'interaction Tim-3/Gal-9 est impliquée dans de la tolérance par induction de la mort des cellules Th1 (Sanchez-Fueyo, Tian et al. 2003). Il a été montré que le blocage de la voie Tim-3, en utilisant un Tim-3-Ig, pendant l'induction de tolérance est suffisant pour prévenir la tolérance et conduire à une augmentation de la prolifération et de la production de cytokines. Ces données ont fortement suggéré que Tim-3 régule négativement les réponses des cellules T en induisant directement la suppression de cellules effectrices Th1, mais aussi en induisant une tolérance (Rodriguez-Manzanet, DeKruyff et al. 2009). De plus, l'injection d'Ac neutralisant anti-Tim-3 augmente sensiblement l'EAE, entraînant une maladie aiguë caractérisée histologiquement par une forte infiltration de macrophages activés qui phagocytent les fragments de myéline dans le SNC. Dans les splénocytes de souris vaccinées avec un peptide (PLP 139-151) qui induit l'EAE, le blocage de Tim-3 induit une augmentation de la prolifération et de l'activation des macrophages en absence d'une stimulation par un Ag spécifique (Monney, Sabatos et al. 2002). Un blocage de la voie de signalisation induite par le complexe Tim-3/Gal-9 a été observée au cours de la progression de nombreuses maladies y compris les maladies auto-immunes, tels que le diabète de type I (Chou, Shieh et al. 2009), l'arthrite rhumatoïde (Seki, Oomizu et al. 2008), la SEP, l'encéphalomyélite allergique expérimentale (Zhu, Anderson et al. 2005 ; Koguchi, Anderson

et al. 2006), les troubles allergiques (Niwa, Satoh et al. 2009 ; Sziksz, Kozma et al. 2010) et le rejet de greffe (Wang, He et al. 2008).

L'expression de Gal-9 dans le système immunitaire est régulée en fonction de l'état d'activation des cellules T (Zhu, Anderson et al. 2005). Néanmoins, son expression est forte dans les régions tissulaires abondantes en IFN- γ (Asakura, Kashio et al. 2002 ; Imaizumi, Kumagai et al. 2002), témoignant ainsi que le système immunitaire a un rôle important dans la régulation des cellules Th1 dans les tissus périphériques. La capacité de l'interaction Tim-3/Gal-9 à moduler négativement la population Th1 en différenciation terminale a suscité un intérêt de l'implication potentielle de Tim-3 dans les maladies auto-immunes. Dans ce contexte, le blocage de Tim-3 pendant l'induction de l'EAE, aggrave la progression de la maladie chez les souris induites par une SEP humaine, cela en augmentant le nombre de foyers inflammatoires dans le SNC et en périphérie (Nicole 2012). Chez la souris, le traitement avec la Gal-9-Fc permet d'atténuer les réponses Th1, alors que la suppression de l'expression de Gal-9 induit à une augmentation de l'EAE. *In vitro*, Gal-9 déclenche le flux de calcique, l'adhésion et l'agrégation des cellules Th1 qui sont suivis de la mort cellulaire, qui survient environ 4h après le traitement avec Gal-9-Fc. De plus, L'injection d'Ac anti-Gal-9 induit la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ par les Th1 (Sabatos, Chakravarti et al. 2003). Chez l'homme, il a été montré qu'une dérégulation de la production d'IFN- γ par les LT CD4⁺/Tim-3⁺ contribue à la formation de la SEP (Koguchi, Anderson et al. 2006). L'ensemble de ces résultats montrent que le système Gal-9/Tim-3 peut être considéré comme une cible thérapeutique (Zhu, Anderson et al. 2005 ; Koguchi, Anderson et al. 2006 ; Chou, Shieh et al. 2009).

1.3.1.3. Rôle de Tim-3 dans l'immunité antitumorale

Bien que Tim-3 ait pris une grande importance dans l'immunothérapie antitumorale grâce à son effet inhibiteur sur les TIL, de nouvelles données ont montré que Tim-3 a un effet sur la réponse immunitaire par le moyen d'autres voies. L'expression de Tim-3 sur les TIL induit l'activité cytotoxique des MDSC *via* l'interaction avec son ligand Gal-9, qui est fortement exprimé dans les cellules CD11b⁺Ly6G⁺ (Dardalhon, Anderson et al. 2010). Lors de la stimulation des cellules immunitaires par les TLR, le blocage de Tim-3 entraîne une augmentation de la sécrétion de cytokines. Cet effet est dû à l'action immunosuppressive de Tim-3 dans les MDSC *in vivo* (Anderson 2012). Les MDSC peuvent être utilisés comme des

cibles thérapeutiques dans le cancer car ils ont un effet suppresseur sur les LT, ils sont présents dans un grand nombre de cancer et leur présence est corrélée à un mauvais pronostic clinique (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Depuis, la confirmation du rôle de Tim-3 dans l'augmentation de la prolifération des MDSC dans les tumeurs murines, il a été intéressant de savoir si la neutralisation de Tim-3 aurait un effet clinique positif par le contrôle de l'expansion des MDSC dans la tumeur (Dardalhon, Anderson et al. 2010). Jusqu'à ce jour, aucune étude clinique n'a confirmé le rôle de Tim-3 comme cible thérapeutique.

En ce qui concerne la Gal-9, elle est exprimée par les lymphomes de Hodgkin, impliquant un rôle dans la biologie de la tumeur (Tureci, Schmitt et al. 1997). Jusqu'à maintenant, la plupart des études qui étudiaient le niveau d'expression de Gal-9 ont montré une plus forte expression dans les tissus normaux par rapport aux tissus tumoraux (Lahm, Andre et al. 2001). Les lignées du cancer du sein, du poumon, de mélanome, du rein et de la prostate ont montré une faible ou une absence d'expression de gal-9. Ces observations sont en corrélation avec d'autres études protéomiques et transcriptomiques où il est montré une diminution de son expression au cours de la transformation maligne (Kageshita, Kashio et al. 2002). En revanche, la Gal-9 est exprimée dans la leucémie et dans le cancer du côlon. Pour les lignées cellulaires dérivées de tumeurs du système nerveux et des ovaires, l'expression de Gal-9 varie en fonction du sous-type (Lahm, Andre et al. 2001). Fait intéressant, les galectines sont de plus en plus reconnues comme marqueurs pronostics des tumeurs malignes (Danguy, Camby et al. 2002; Kageshita, Kashio et al. 2002). Des résultats similaires ont été obtenus dans le mélanome, le carcinome à cellules squameuses du col et le carcinome hépatocellulaire (van den Brule, Califice et al. 2004 ; Liang, Ueno et al. 2008). De plus, les molécules inhibant la Gal-1 (Brandwijk, Dings et al. 2006 ; Ito, Scott et al. 2011; Ito and Ralph 2012) et la Gal-3 (Nangia-Makker, Hogan et al. 2002; Liu, Huang et al. 2008 ; Glinskii, Sud et al. 2012) ont montré des effets antitumoraux suggérant que l'administration de la Gal-9 est bénéfique (Wiersma, de Bruyn et al. 2013). De plus, dans des modèles de leucémies et de myélomes, le traitement avec la Gal-9 entrave la progression tumorale en induisant l'apoptose (Kuroda, Yamamoto et al. 2010). En outre, l'administration de la Gal-9 interfère avec également la progression tumorale dans des modèles murins de mélanome et de cancer du côlon en inhibant l'apparition de métastases (Nobumoto, Nagahara et al. 2008). De façon inattendue, la Gal-9 potentialise la réponse immunitaire dans le mélanome en activant les DC et en potentialisant les cellules NK. Un effet similaire a été observé dans un modèle murin de cancer du poumon, où la Gal-9 induit la différenciation des macrophages à partir des DC

plasmacytoïdes (pDC) (Kadowaki, Arikawa et al. 2012). Ces résultats sont prometteurs et justifient la poursuite de la recherche sur l'effet de l'administration de la Gal-9 dans les différents types de cancer pour optimiser les fonctions immunitaires.

1.3. CTLA-4

CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) est une molécule qui appartient à la famille des protéines membranaires CD28 et a été montré comme ayant un rôle important dans la suppression de la réponse immunitaire exercée par les cellules T. CTLA-4 est exprimé à la surface des cellules T, l'engagement du récepteur d'activation CD28 induit une augmentation de son expression (Walunas 1994). En effet, l'engagement de CD28 induit non seulement l'activation des LT mais aussi l'expression de CTLA-4, ce qui permet la régulation de l'activation des LT. Les deux ligands de CTLA-4 connus à ce jour sont B7.1 et B7.2 qui sont aussi les ligands de la protéine costimulatrice CD28, ce qui montre la complexité des voies de signalisation CD28/CTLA-4 (Salomon, Rhee et al. 2001). CTLA-4 a un effet inhibiteur dès le début de l'activation des cellules T en induisant la diminution de la prolifération, de la sécrétion d'IL-2, l'expression des cyclines et la modulation de la voie de signalisation du TCR (Fife and Bluestone 2008). En outre, CTLA-4 est une molécule antagoniste qui se lie à B7.1 et B7.2, empêchant celles-ci de se lier à CD28. CTLA-4, est une protéine transmembranaire homodimérique de type 1, qui est exprimée de façon transitoire à la surface des LT, 24 à 48h après leur activation. En revanche elle est exprimée constitutivement dans les cellules Treg (Walunas 1994). CTLA-4 a une plus forte affinité et avidité pour B7.1 et B7.2 que CD28. Cet effet antagoniste est dû à la structure en treillis de CTLA-4 au niveau de la SI qui induit un signal d'inhibition (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004; Salama and Hodi 2011). L'interaction CTLA-4/B7.1 possède une plus forte affinité que celle de CTLA-4 avec B7.2, alors que l'interaction CD28/B7.2 est plus affine qu'avec le partenaire B7.1 (Collins, Brodie et al. 2002). CTLA-4 est une protéine contenant un domaine hydrophobe extracellulaire et un domaine cytoplasmique, ce dernier contenant un motif ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) qui recrute la phosphatase Src qui est composée d'une phosphatase SHP-1 et SHP-2 afin de réduire l'activation des LT. Le taux d'expression de CTLA-4 est corrélé au seuil d'activation des cellules T (Walunas 1994). Plusieurs études ont montré que les cellules T activées spécifiques de l'Ag expriment fortement CTLA-4. Par conséquent, ces cellules sont les premières à être inhibées à la fin de l'élimination totale du pathogène (Fife and Bluestone 2008). Les souris CTLA-4^{-/-} présentent une lympho-prolifération au niveau des viscères et une destruction des tissus, qui est létale après 3 à 4 semaines de la naissance

(Tivol, Borriello et al. 1995 ; Waterhouse, Penninger et al. 1995; Chambers, Sullivan et al. 1997) démontrant ainsi l'importance de la voie de signalisation de CTLA-4 dans la modulation de la réponse des cellules T dans l'homéostasie. La molécule CTLA-4 correspond donc à une cible thérapeutique idéale et de grand intérêt dans le traitement des maladies auto-immunes et dans la prévention des rejets de greffe d'organes.

2. Neutralisation des récepteurs « *checkpoints* » en immunothérapie

L'immunothérapie consiste en l'injection de composants, moléculaires ou cellulaires, ayant un rôle dans le développement de la réponse immunitaire antitumorale. Il existe deux grandes approches en immunothérapie antitumorale : l'immunothérapie « passive » et l'immunothérapie « active ». L'immunothérapie active consiste en l'utilisation de vaccin et cela a été rendu possible grâce à la découverte et à la caractérisation des TAA. De nos jours, le développement d'une vaccination antitumorale est devenu un enjeu important en l'immunothérapie. En revanche l'immunothérapie passive consiste à transférer des TIL, de LAK (*lymphocytes activated killer*) ou des NK autologues chez le patient après stimulation et amplification *in vitro* (Rosenberg et al., 1988). Cette approche, appelée immunothérapie adoptive, a été mise au point après plusieurs observation dans cancers d'une réduction importante des cellules de la réponse immunitaire infiltrant la tumeur.

Dans le mélanome, les thérapies cellulaires semblent prometteuses grâce à l'utilisation de TIL amplifiés *in vitro* avant de les réinjecter chez le patient. Le taux de réponse varie de 49% à 70% sur la base des premières études cliniques de phase 1 (Rosenberg 2011). Ces résultats impressionnants ont été critiqués à de nombreuses reprises pour leur taux de réponse. D'ailleurs, des études similaires et plus récentes ont montré un taux de réponse plus faible qui avoisine des taux de 24 à 29% (Pilon-Thomas, Kuhn et al. 2012; Dudley, Gross et al. 2013). De manière intéressante, chez les patients qui ont une réponse complète, celle-ci semble être de longue durée, contrairement aux répondeurs partiels qui ont une réponse de quelques mois (Besser, Shapira-Frommer et al. 2013). Des résultats divergents sont obtenus avec l'utilisation de l'ipilimumab (Anti-CTLA-4), où une réponse partielle est stabilisée sur une longue durée (Prieto, Yang et al. 2012 ; Wolchok, Weber et al. 2013) (Di Giacomo, Calabro et al. 2013). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les LT transférés sont dans un état d'épuisement. De plus l'utilisation des anti-CTLA-4 provoque des réactions immunitaires (effets secondaires) qui peuvent donc être fatales telles que : l'entérocologie,

l'hépatite, la dermatite, la neuropathie et l'endocrinopathie. Par conséquent, il serait intéressant d'utiliser et de neutraliser les autres voies d'inhibitions comme PD-1/PD-L1, en les combinant avec le transfert adoptif de TIL ou une thérapie avec des cellules T génétiquement modifiées (Kalos, Levine et al. 2011 ; Pardoll 2012).

Le phénomène d'épuisement a été montré pour la première fois des LT dans des modèles d'infection virale de type choriomeningite lymphocytaire chronique chez la souris (Zajac, Blattman et al. 1998). Depuis, le même phénomène d'épuisement a été observé chez l'homme dans des maladies cancéreuses (Wherry 2011). L'épuisement est caractérisé par une incapacité à proliférer et à exercer une fonction effectrice telle que la cytotoxicité et la sécrétion de cytokines en réponse à une stimulation antigénique. Néanmoins, l'épuisement est un processus progressif avec une perte de la fonction CTL, suivie par la diminution de la production d'IL-2, puis du TNF- α et enfin la perte totale de la sécrétion d'IFN- γ (Wherry, Blattman et al. 2003).

Le premier marqueur de l'épuisement identifié dans les LT est le récepteur inhibiteur PD-1 (Barber, Wherry et al. 2006). Le blocage de la voie PD-1 inverse partiellement l'état dysfonctionnel et restaure la fonction effectrice des cellules T (Barber, Wherry et al. 2006). Cependant, le blocage de PD-1 et PD-L1 n'inverse pas complètement l'épuisement des cellules T, indiquant qu'il existe d'autres médiateurs inhibiteurs qui interviennent. En effet, des études ont identifié l'expression de Tim-3 sur les lymphocytes épuisés dans les cancers humains (Fourcade, Sun et al. 2010 ; Baitsch, Baumgaertner et al. 2011) et dans des modèles animaux (Sakuishi, Apetoh et al. 2010 ; Zhou, Munger et al. 2011). En effet, une coexpression de Tim-3 et PD-1 est fréquemment observée dans une grande fraction de cellules T activées (Sakuishi, Apetoh et al. 2010 ; Takamura, Tsuji-Kawahara et al. 2010) dont les TIL CD8⁺, ce qui engendre une inhibition totale de leur fonction. En tenant compte de ces observations, il a été montré que le blocage des voies de signalisation Tim-3 et de PD-1 entraîne une meilleure restauration des fonctions effectrices des T CD8⁺ (Fourcade, Sun et al. 2010) et un effet sur la croissance tumorale (Sakuishi, Apetoh et al. 2010 ; Ngiow, von Scheidt et al. 2011; Zhou, Munger et al. 2011). En effet, le blocage de Tim-3 et PD-1 peut être utilisé en prophylaxie et dans les traitements thérapeutiques contre une grande variété de cancers (Ngiow, von Scheidt et al. 2011). La double expression de PD-1 et de Tim-3 est caractérisée par une forte activité immunosuppressive, alors que les cellules T PD-1⁺ Tim-3⁻ conservent partiellement leur fonction effectrice. Dans ce modèle, le blocage de la voie de

PD-1 rétablit partiellement la fonction des cellules T, mais le blocage combiné de Tim-3 et PD-1 améliore de manière synergique les réponses des LT (Jin, Anderson et al. 2010; Sakuishi, Apetoh et al. 2010). Par conséquent, la neutralisation de Tim-3 et de PD-1 peut être une thérapie attractive dans le traitement du cancer (**Fig. 14**).

Ainsi, l'épuisement des cellules T effectrices fait intervenir l'expression de plusieurs récepteurs inhibiteurs entraînant une inactivation complète. Dans l'auto-immunité, l'expression de ces récepteurs inhibiteurs a un rôle bénéfique pour l'atténuation de la maladie. Par conséquent, l'induction de l'épuisement des cellules T est préjudiciable dans les infections virales chroniques et le cancer, mais serait bénéfique dans l'auto-immunité.

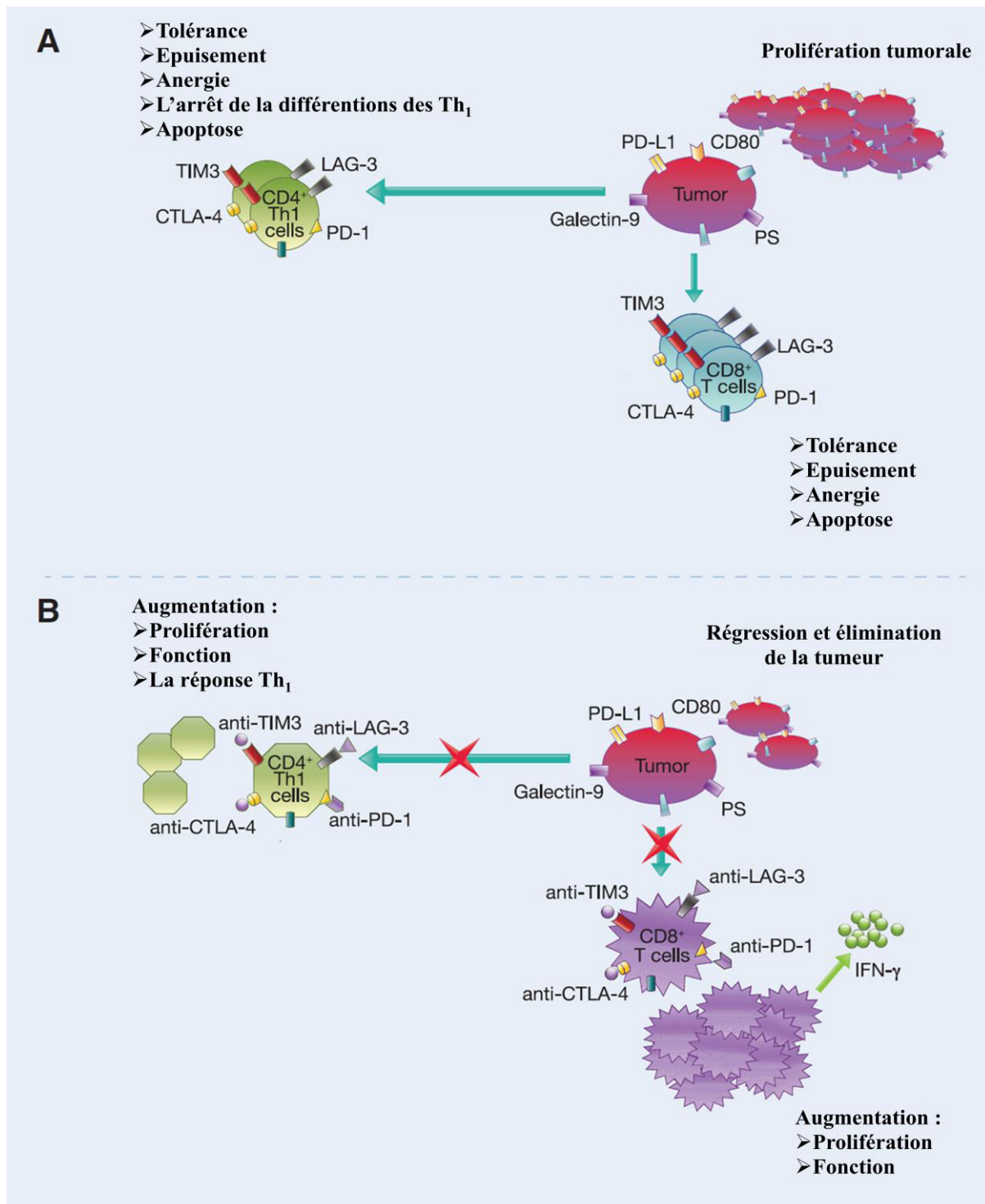


Figure 14. Les différentes stratégies de blocage des récepteurs inhibiteurs. A. Les cellules cancéreuses expriment un panel de ligands membranaires inhibiteurs tels que Gal-9 et PDL1 afin de pouvoir échapper à la réponse immunitaire exercée par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. La reconnaissance du ligand des cellules tumorales par les récepteurs exprimés par les lymphocytes T comme Tim3, PD1 et CTLA4 entraîne une phase d'épuisement, d'anergie voire la mort par apoptose des lymphocytes T. B. Le blocage des récepteurs inhibiteurs restaure les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T ainsi que leur prolifération. Ce qui aboutit à la lyse spécifique des cellules tumorales par les lymphocytes T (Ngiow, Teng et al. 2011).

Chapitre IV

IV. LES CANCERS BRONCHIQUES ET L'IMMUNOTHERAPIE

1. Les cancers bronchiques

1.1. Epidémiologie

Peu connus jusqu'au début du vingtième siècle, la répercussion des cancers broncho-pulmonaires suit une croissance très rapide et se multiplie rapidement, et cela depuis 1930. En 1985, ce cancer est devenu la première cause de mortalité chez les humains.

1.2. Répercussion

Avec près de 35 000 de nouveaux cas diagnostiqués en 2010, dont 73% survenant chez l'homme, le cancer du poumon est le quatrième cancer le plus fréquent, pour les deux sexes avec un niveau proche du cancer colorectal. Il constitue 10% du total des nouveaux cas de cancer. Chez les hommes, il est en seconde position, avec 25 000 nouveaux cas (soit 13,3%), après le cancer prostatique. Chez les femmes, il se positionne troisième avec 10 000 nouveaux cas (soit 6,5%), après le cancer du sein et le cancer colorectal. 50% de ces cas se déclenchent après 50 ans, l'incidence du cancer du poumon est presque similaire pour l'homme et la femme. Chez l'homme, l'apparition du cancer du poumon est en nette augmentation jusqu'à la fin des années 1990 puis elle s'est inversée dans les années 2000. Le taux d'incidence a diminué de 51,9 à 50,5 pour 100 000 individus entre 2000 et 2005, avec une baisse moyenne annuelle de 0,5%. Cela s'explique par la réduction de l'habitude tabagique en France, une tendance également notée dans les pays industrialisés comme la Grande Bretagne ou les États-Unis. En revanche, chez les femmes, l'incidence est passée de 3,6 en 1980 à 12,6 pour 100 000 individus en 2005, soit une évolution annuelle de 5,1%. Cette tendance progressive, en connexion avec le développement de l'usage du tabac chez les femmes, qui est également notée dans la majorité des pays occidentaux. En 2010, l'incidence était de 51,9 cas pour 100 000 pour les hommes et 17,8 cas pour 100 000 cas pour les femmes.

1.3. Décès

Le cancer du poumon est un cancer de mauvais pronostic. Les taux relatifs de survie à 1 et 5 ans chez les patients diagnostiqués entre 1989 et 1997, sont respectivement 43% et 14%. Les données provenant du réseau FRANCIM (France-Cancer-Incidence et Mortalité), créé en 1991, indique un pronostic moins favorable pour les patients âgés de plus de 75 ans (8%) que pour les plus jeunes. Ce taux est resté stable tout au long de ces années. En effet, aucun progrès dans la survie n'a été observé en France entre 1989-1997 (Cogliano, Baan et al. 2011).

2. Les différents types de cancers broncho-pulmonaires

Les agents carcinogènes induisent des effets différents, selon leur composition, sur les cellules du tissu bronchique. De ce fait, on peut observer différents types de cancer du poumon. En fonction de leurs aspects anatomiques et physiologiques, ces derniers se divisent en deux groupes : les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques à non petites cellules (CBNPC).

2.1. Les cancers bronchiques à petites cellules

Le CBPC est la forme la plus agressive du cancer du poumon et représente environ 13 à 20% des tumeurs malignes pulmonaires (Holdenrieder, von Pawel et al. 2008), sachant que 95% des CBPC sont liés au tabac. Ils se développent à partir de cellules neuroendocrines qui recouvrent l'épithélium des bronches pulmonaires près du centre du thorax. Sans traitement, la durée médiane de survie est seulement de 3-4 mois. La proportion du CBPC a diminué de 17,26% en 1986 à 12,95% en 2002 (Cohen and Matthews 1978). La proportion de femmes ayant un CBPC a augmenté de 28% en 1973 à 50% en 2002 (Govindan, Page et al. 2006). La plupart des patients (environ 70%) présentent un stade avancé au premier diagnostic car la maladie est hautement métastatique principalement vers les os, la moelle osseuse, le foie, les glandes surrénales et le cerveau (Kristjansen and Hansen 1990 ; Moss, Jacobson et al. 2009). La première ligne de traitement est une chimiothérapie à base de cisplatine qui est le seul traitement du CBPC et qui augmente la survie globale avec la même toxicité (Le Pechoux, Dhermain et al. 2004). Des études ont montré une réponse de 60 à 70 % chez les patients atteints de CBPC, mais la survie moyenne n'est pas meilleure et elle n'est que de 10 mois parce que 70% des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de la maladie avec une évolution clinique agressive. Une détection précoce peut avoir une influence considérablement positive sur le résultat du traitement.

2.2. Les cancers bronchiques non à petites cellules

Les CBNPC représentent environ 75 à 80 % de la totalité des cancers bronchiques. Il s'agit d'une maladie à évolution lente qui ne métastase pas très rapidement. Les CBNPC sont peu sensibles à la chimiothérapie par rapport aux CBPC. Ils sont généralement traités par excision chirurgicale à but curatif. Néanmoins, la chimiothérapie est préférentiellement utilisée à la fois avant la chirurgie (chimiothérapie néoadjuvante) et après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante). Les CBNPC sont classés en carcinome épidermoïde (CEP), carcinome à grandes cellules (CGC), et l'adénocarcinome (ADC). Cependant, il existe de nombreux types moins

fréquents qui peuvent se produire dans des variantes histologiques inhabituelles ou des combinaisons mixtes de type cellulaires (Pirozynski 2006). Le cancer du poumon chez les non-fumeurs est presque exclusivement CBNPC, avec une majorité importante d'adénocarcinome.

2.2.1. L'adénocarcinome bronchique

Ces dernières décennies, l'ADC du poumon est le type le plus commun du cancer du poumon chez les patients non-fumeurs et les femmes (Singh, Pillai et al. 2011). Les ADC représentent environ 40% de l'ensemble des CBNPC. Cette catégorie de tumeurs regroupe plusieurs sous-types dont le carcinome broncho-alvéolaire qui se développe à partir des cellules constituant les alvéoles.

2.2.2. Le carcinome épidermoïde

Le CEP du poumon est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes et représente environ 40% de l'ensemble des CBNPC. Il se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon. Il est fortement corrélé au tabagisme, plus que la plupart des autres types de cancer du poumon. Selon les études, le risque relatif de CEP est d'environ 5,5 plus fort chez les personnes ayant fumé pendant de 1 à 20 ans en comparaison aux personnes qui n'ont jamais fumé. L'augmentation du risque relatif est d'environ 16 fois avec une durée de 30 à 40 ans, et environ 22 à plus de 40 ans (Aisner and Marshall 2012).

2.2.3. Le carcinome à grandes cellules

Le CGC du poumon est un groupe hétérogène de néoplasmes malins non différenciés résultant de cellules épithéliales transformées dans le poumon. Le CGC représente environ 10%-20% de tous les CBNPC. Le CGC se distingue du CBPC principalement par la plus grande taille des cellules anaplasiques, un rapport cytoplasmique plus élevé par rapport à la taille du noyau. De plus, la croissance des CGC est plus rapide que pour les autres formes de CBNPC.

3. Les facteurs de risques

Le CBNPC est un cancer où le tabagisme actif représente un facteur de risque bien avéré. Néanmoins, son apparition serait multifactorielle. De plus, un ensemble complexe de facteurs peuvent participer à son extension de façon synergique. Une meilleure compréhension du processus génétique du CBNPC montre que des interactions entre les facteurs environnementaux et génétiques entrent en jeu dans l'apparition des CBNPC. Le rôle d'un certain nombre de facteurs de risque dans la survenue du cancer bronchique a été prouvé, tels que :

- Le tabac (Jamrozik 2006; Cogliano, Baan et al. 2011).
- Le tabac passif (Taylor, Najafi et al. 2007).
- Le Radon (Brown, Darnton et al. 2012).
- Les radiations X (Parkin and Darby 2011).
- L'Amiante (Frost, Darnton et al. 2011).
- La silice (Pelucchi, Pira et al. 2006 ; Erren, Morfeld et al. 2011).
- Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (Samet 2004).
- Les particules de diesel (Silverman, Samanic et al. 2012 ; Tsoi and Tse 2012).
- Le Cancer et le traitement précédent (Brenner, McLaughlin et al. 2011 ; Zhan, Suo et al. 2011 ; Brenner, Boffetta et al. 2012; Ibrahim, Kazkaz et al. 2013).
- L'hérédité (Cote, Liu et al. 2012).
- La maladie pulmonaire précédente (Schonfeld, Curtis et al. 2012 ; Ibrahim, Kazkaz et al. 2013).
- Le HIV (Grulich, van Leeuwen et al. 2007 ; Shiels, Cole et al. 2009).

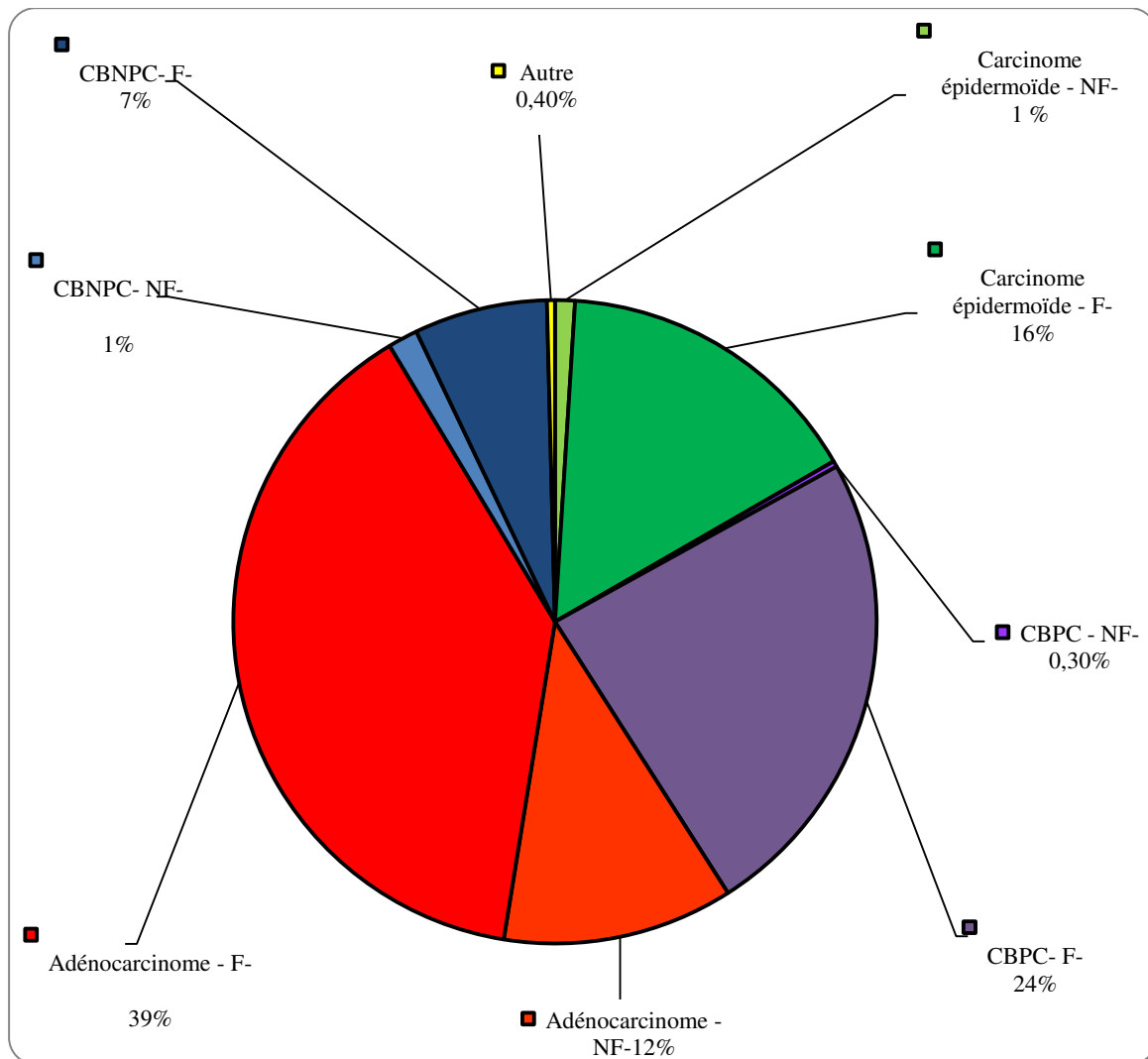


Figure 13. Diagramme de l'incidence du cancer du poumon. Représentation graphique de l'incidence du cancer bronchique sur la base de deux critères : du type histologiques et fumeurs (F) et non-fumeurs (NF) (d'après (Kenfield, Wei et al. 2008))

4. Les avancées de l'immunothérapie dans les cancers bronchiques

Jusqu'à présent, la chirurgie est l'approche thérapeutique la plus efficace pour traiter le cancer bronchique. La chirurgie est un traitement local du cancer qui a pour but d'éliminer la tumeur. La chirurgie peut aussi être utilisée pour retirer les métastases ou les ganglions lymphatiques envahis par les cellules cancéreuses. Elle est assurément l'approche la plus ancienne utilisée pour soigner les cancers. Néanmoins, à cause du diagnostic trop tardif, 80% des cancers ne peuvent être opérés car les tumeurs CBNPC atteignent rapidement le stade 3a en absence de traitement. Le traitement utilisé dans le cancer du poumon ne répond pas de la même manière chez les patients atteints de CBNPC et de CBPC. Depuis plusieurs années, la prise en charge

des patients est personnalisée en fonction de plusieurs critères tels que du type histologique et le stade. Cette approche est souvent combinée à d'autres traitements de référence telles que :

i) La chimiothérapie qui consiste à utiliser des médicaments pour éliminer les cellules cancéreuses. Même si, elle est le traitement préférentiel dans la plupart des cas, mais la toxicité reste importante, et la tumeur peut acquérir une résistance vis-à-vis du traitement. Afin de diminuer cette toxicité, la combinaison des approches thérapeutiques avec différentes molécules est de plus en plus recommandée.

ii) La radiothérapie qui est un traitement qui utilise des rayons à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Au cours des 20 dernières années, la radiothérapie a connu un essor considérable grâce à d'importants progrès techniques. Environ 60% des patients atteints d'un cancer ont besoin, au cours de leur maladie, d'une radiothérapie. De plus, la radiothérapie est fréquemment utilisée lorsque la tumeur est bien localisée. Bien que le traitement vise essentiellement les cellules tumorales en expansion, il y a apparition d'effets secondaires importants qui touchent l'organisme. Ces différentes thérapies utilisent des médicaments tels que l'Erlotinib (Tarceva®, inhibiteur de l'EGFR), le Bevacizumab (Avastin®, Anti-VEGF) ou encore le Gefitinib (Iressa®, inhibiteur de l'EGFR).

C'est dans ce contexte que l'immunothérapie a émergé, amenant l'espoir d'un traitement antitumoral plus spécifique, donc moins toxique et plus efficace. L'immunothérapie a pour but d'éliminer les cellules tumorales sans altérer le fonctionnement des cellules normales. L'objectif est d'augmenter l'efficacité des cellules effectrices de la réponse immunitaire antitumorale. Dans les cancers bronchiques, seul le Bevacizumab (Avastin®) a eut une autorisation de mise sur le marché (AMM) et fait partie des traitements courants. Actuellement, plusieurs essais cliniques analysent l'efficacité des Acm dans le traitement des cancers bronchiques, en particuliers ceux déjà mis sur le marché pour d'autres cancers. De nos jours d'autres cibles sont analysées telles que les molécules impliquées dans l'épuisement des CTL comme CTLA-4 ou PD-1. Ainsi l'Ipilimumab, un Acm neutralisant dirigé contre le récepteur inhibiteur CTLA-4 est en cours d'essai clinique dans plusieurs types de cancer comme dans les CBNPC. Des résultats prometteurs ont été observés dans une étude clinique combinant la chimiothérapie au carboplatine/paclitaxel (Tomasini, Khobta et al. 2012). Le succès récent des Acm neutralisants anti-PD-1 et anti-PD-L1 en immunothérapie antitumorale dans plusieurs types de tumeurs solides, y compris les CBNPC, témoigne de l'importance de cette cible dans la résistance des cellules tumorales au système immunitaire (Topalian, Hodi et al. 2012 ; Champiat, Ileana et al. 2014). Il serait intéressant de combiner les anti-CTLA-4 et

les anti-PD-1 en thérapie afin de voir si on obtient un effet synergique au niveau de la réponse immunitaire.

Il existe aussi une autre approche immunothérapique à base de vaccin utilisant des peptides et des protéines, comme le vaccin à base d'Ag MAGE-A3 qui est exprimé par environ 35 à 50 % des cancers du poumon. Il s'agit d'un vaccin comprenant une protéine recombinante de MAGE-A3 associée à l'immuno-adjuvant AS02B et qui a donné d'excellents résultats en phase II (Mellstedt, Vansteenkiste et al. 2011). Bien que les objectifs n'aient pas été atteints, les résultats ont été considérés suffisants pour lancer une étude de phase III qui concernera 2300 patients ayant une tumeur de stade IB, II et III réséquée et exprimant MAGE-A3. Malheureusement, cette étude clinique de phase III supervisée par « GlaxoSmithKline » n'a pas abouti aux résultats souhaités ni dans le mélanome ni dans les CBNPC.

Un autre essai clinique ciblant la protéine MUC1 qui est exprimé par environ 30 à 70 % des cancers bronchiques à l'aide du vaccin L-BLP25 (Stimuvax®, par Merck-Serono). Il s'agit d'un vaccin à base de liposomes contenant une séquence de 25 aa dérivés du domaine extracellulaire de cette protéine (Sangha and Butts, 2007). Le vaccin contient aussi un adjuvant qui active les APC par le l'intermédiaire des TLR-4 (Cluff 2009). Le bénéfice le plus important de cet essai clinique de phase IIB a été observé chez les patients atteints de CBNPC localement avancée. Un autre essai clinique de phase III est en cours (essai INSPIRE). Il existe aussi un autre vaccin dirigée contre MUC1, appelée TG4010, qui est un vecteur viral recombinant exprimant à la fois MUC1 et IL-2. Des essais cliniques de phase IIB et III à base de TG4010 sont en cours.

OBJECTIF DES TRAVAUX

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une réponse immunitaire antitumorale dans de nombreux cancers, y compris les CBNPC (Taylor, Najafi et al. 2007). De plus, des régressions tumorales spontanées observées chez certains patients atteints de CBNPC confirment l'hypothèse de la mise en place d'une réponse immunitaire (Gladwish, Clarke et al. 2010). Sur la base de travaux épidémiologiques, il a été montré que l'infiltration de la tumeur par des LT, en particulier les LT CD8⁺ cytotoxiques, est un bon marqueur de survie globale (Stayner, Bena et al. 2007). Cependant, le développement clinique des tumeurs ainsi que la formation de métastases montrent l'incapacité de ces effecteurs cytotoxiques à contrôler efficacement la croissance tumorale et à induire sa régression. En effet, de nombreux mécanismes d'échappement tumoral à l'immunosurveillance ont été décrits. La compréhension des voies permettant le développement et l'optimisation de l'activité antitumorale des effecteurs immunitaires, notamment les CTL infiltrant la tumeur, correspond donc à un enjeu majeur dans la conception de nouvelles approches d'immunothérapie menant à induire une meilleure réponse immunitaire spécifique de la tumeur. Dans ce contexte, le but de ma thèse a été d'étudier i) l'infiltration des lymphocytes T CD8⁺/CD103⁺ au cours de la réponse CTL antitumorale dans les tumeurs épithéliales, ii) le rôle de CD103 dans la régulation de leurs fonctions effectrices *in situ*, iii) l'impact de son expression sur la survie des patients atteints CBNPC. Les précédentes études de mon équipe ont montré que la molécule CD103, exprimée à la surface des CTL CD8⁺, représente un médiateur cytotoxique majeur pour la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales d'origine épithéliales (IARC 2001). C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse.

Les objectifs de mon travail sont :

- 1) Caractériser phénotypiquement et fonctionnellement la sous-population de LT CD8⁺/CD103⁺ infiltrant les tumeurs de patients atteints de CBNPC.
- 2) Etudier l'impact de l'expression de CD103 sur la survie des patients atteints de CBNPC.
- 3) Déterminer le rôle exact de CD103 dans le recrutement et la rétention des LT CD8⁺ au site tumoral et dans l'optimisation de la fonction cytotoxique des LT infiltrant les tumeurs dans un modèle *in vivo* de souris.

Pour réaliser cette étude, je dispose de deux modèles expérimentaux. Le premier modèle d'étude repose sur l'utilisation de TIL prélevés directement de pièces chirurgicales fraîches de patients atteints de CBNPC. Le second modèle, repose sur l'utilisation de souris C57BL/6 sauvages et déficientes pour l'expression de CD103 et dans lesquelles j'ai transplanté la tumeur pulmonaire murine LL2 (*Lewis lung carcinoma*) transfectée avec la E-cadherine et la chimiokine CCL5 (Rantes).

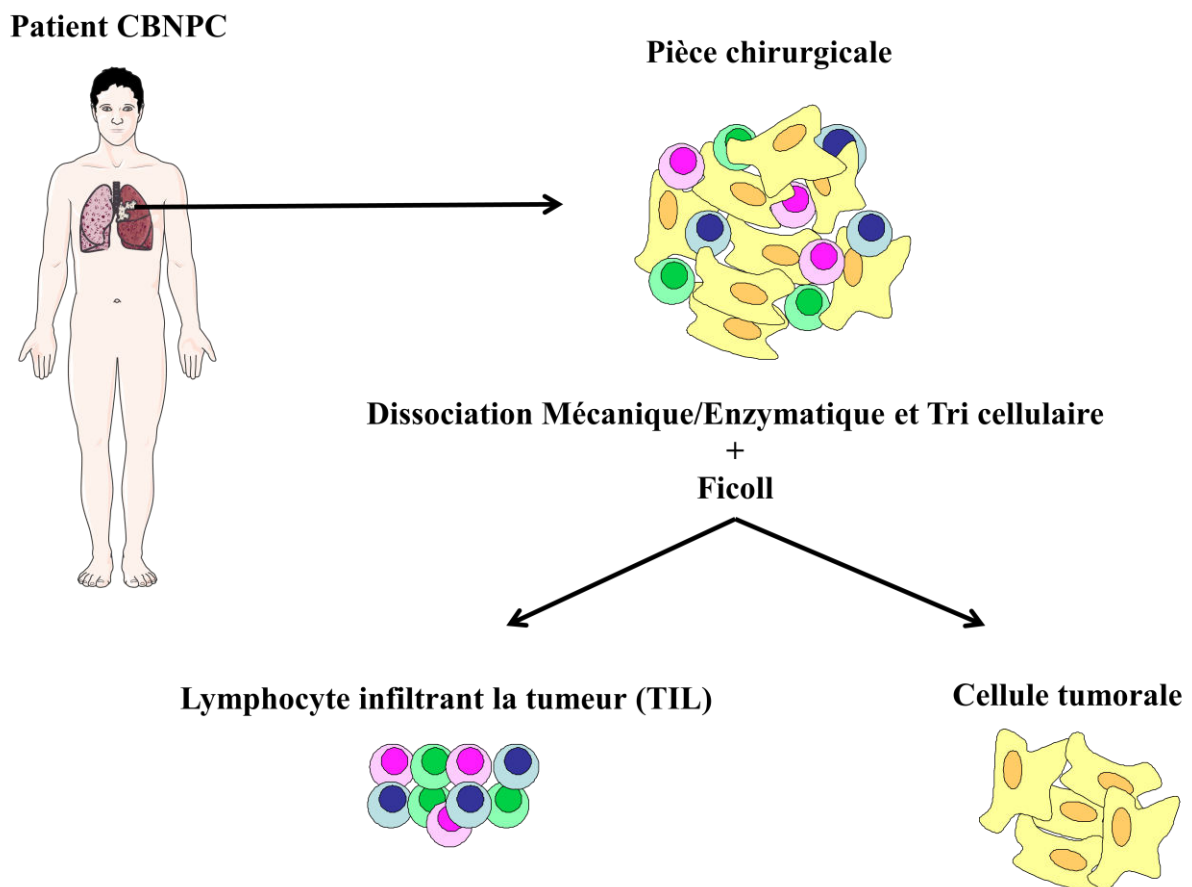


Figure 14. Modèle expérimental humain. Les TIL ont été isolés à partir de prélèvements tumoraux de patients atteints de CBNPC, par tri cellulaire sur la base de leur petite taille.

RESULTATS

RESULTATS

1. CD8⁺/CD103⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are exhausted tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival of lung cancer patients.

❖ Soumis

2. Etude du rôle de l'intégrine CD103 dans le recrutement et la rétention des lymphocytes T CD8⁺ au site tumoral dans un modèle *in vivo* de cancer du poumon.

❖ En préparation

Projet 1 :

1. CD8⁺/CD103⁺ tumor-infiltrating lymphocytes are exhausted tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival of lung cancer patients

Fayçal Djenidi^{1,2,3}, Julien Adam^{2,3,4}, Aicha Goubar^{2,3,4*}, Aurélie Durgeau^{1,2,3*}, Guillaume Meurice^{2,3,5}, Vincent de Montpréville^{1,6}, Pierre Validire⁷, Benjamin Besse^{2,3,8} and Fathia Mami-Chouaib^{1,2,3#}

¹ INSERM (Institut national de la Santé et de la Recherche médicale) Unité 753, 94805 Villejuif, France.

² Gustave Roussy, Villejuif, France.

³ Université Paris-Sud, 91400 Orsay, France

⁴ INSERM U981, Gustave Roussy, Villejuif, France.

⁵ Gustave Roussy, Plateforme de Bioinformatique, Villejuif, France.

⁶ Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Service d'Anatomie Pathologique, 92350 Le-Plessis-Robinson, France.

⁷ Institut Mutualiste Montsouris, Service d'Anatomie-Pathologie, 75014 Paris, France.

⁸ Gustave Roussy, Département de Médecine, Villejuif, France.

* Contributed equally to this work

Running title: Role of CD8⁺/CD103⁺ TIL in antitumor CTL response

Key words: CD103, CTL, T_{RM}, Exhaustion, PD-1

Corresponding author: Fathia Mami-Chouaib, INSERM U753, Team 1: Tumor antigens and T-cell reactivity, Gustave Roussy. 114, rue Édouard Vaillant, F-94805 Villejuif. Phone: +33 1 42 11 49 65, Fax: +33 1 42 11 52 88, e-mail: fathia.mami-chouaib@gustaveroussy.fr

Potential conflict of interest: The authors have no conflict of interest.

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; AICD, activation-induced cell death; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DFS, disease free survival; MHC-I, major histocompatibility complex class I;

NSCLC, non small-cell lung carcinoma; LCC, large cell carcinoma; PBMC: peripheral blood mononuclear cell; OS, overall survival; SCC, Squamous cell carcinoma; TCR, T-cell receptor; TIL, tumor-infiltrating lymphocytes; T_{RM}, tissue-resident memory.

Abstract

We previously demonstrated the role of CD103 integrin on tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in triggering T-cell receptor (TCR)-mediated epithelial tumor cell cytotoxicity. Here, we show that CD8⁺/CD103⁺ TIL, freshly isolated from human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) specimens, display transcriptomic and phenotypic signatures characteristic of tissue-resident memory (T_{RM}) T cells. Our results also indicate that this T-cell subpopulation exhibits increased activation-induced cell death (AICD), coexpresses PD-1 and Tim-3 and mediates specific cytotoxic activity toward autologous tumor cells upon blockade of PD-1-PD-L1 interaction. Moreover, CD103 facilitates TIL infiltration within epithelial tumor regions, and enhanced CD103⁺ TIL subset correlates with improved patient survival. These findings emphasize the role of CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} lymphocytes in promoting intratumoral cytotoxic response and support the rational of the use of anti-PD-1 blocking antibodies in reversing tumor-induced T-cell exhaustion in NSCLC patients.

Introduction

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a major role in antiviral and antitumor immune responses through directional exocytosis of cytotoxic granules, specialized secretory lysosomes containing perforin and granzymes, into the specific target leading to cell death (Bossi, Trambas et al. 2002). Integrins and their cognate ligands are essential in TCR-mediated target cell killing. Indeed, although TCR engagement is necessary for inducing the cytotoxic activity of specific CD8⁺ T lymphocytes, integrins, mainly LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$), play a crucial role in triggering CTL effector functions. It is now well established that interaction of LFA-1 with its ligand ICAM-1 is necessary for effective target cell lysis by the released granules (Anikeeva, Somersalo et al. 2005). CD103 ($\alpha_E\beta_7$) integrin also plays a pivotal role in epithelial target cell lysis by specific CD8⁺ T cells. Indeed, we have previously reported that interaction of CD103 on tumor-specific TIL with its ligand, E-cadherin, on tumor cells is necessary for positioning of the cytotoxic granules near the interface and their delivery into the target leading to lysis of the latter cell (Le Floch, Jalil et al. 2007). CD103 is expressed at high levels by mucosal CD8⁺ T lymphocytes, in particular intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) (Kilshaw and Murant 1990), but it is also found on mucosal mast cells and dendritic cells (DC) (Sung, Fu et al. 2006), CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells (Annacker, Coombes et al. 2005), and on a large proportion of CD8⁺ T cells infiltrating epithelial tumors, including pancreatic (French, Cresswell et al. 2002), colorectal (Quinn, Hawkins et al. 2003), ovarian (Webb, Wick et al. 2010) and lung cancers (Le Floch, Jalil et al. 2007). It is induced on CD8⁺ T lymphocytes upon TCR engagement and exposure to TGF- β 1, abundant within the tumor microenvironment, through binding of NFAT-1 and Smad2/3 transcription factors to the promoter and enhancer elements of the *ITGAE* gene, which encodes CD103 (Mokrani, Klibi et al. 2014).

CD103 ligation to E-cadherin not only promotes antigen recognition by favoring T-cell adhesion to specific tumor cells(Franciszkiewicz, Le Floch et al. 2013), but also induces costimulation in activated CTL by triggering signals that cooperate with TCR-mediated signals(Le Floch, Jalil et al. 2011). CD103 has also been described to facilitate retention of effector and memory T lymphocytes within epithelial tissues via interaction with E-cadherin(Gorfu, Rivera-Nieves et al. 2009). Moreover, this integrin serves as a definitive marker of T_{RM} T cells, and accumulating evidence indicated that CD103 is directly involved in intraepithelial retention of T_{RM}(Zhang and Bevan 2013). Remarkably, CD103⁺ T_{RM} lymphocytes play an essential role in protecting human epithelial tissues against viral infections, and this cell subset has been shown to express inhibitory receptors, such as CTLA-4 and PD-1, which were associated with their capacity to maintain peripheral tolerance(Wakim, Woodward-Davis et al. 2012; Mackay, Rahimpour et al. 2013). However, the presence of T_{RM} T cells in human epithelial tumors and their role in antitumor immune response has not been so far systematically addressed. In this report we asked whether CD8⁺/CD103⁺ T cells infiltrating human NSCLC are tumor-specific and whether molecules such as checkpoint inhibitory receptors are involved in modulating their intratumoral activities. Our results indicated that CD8⁺/CD103⁺ lung TIL exhibit T_{RM} features, coexpress PD-1 and Tim-3, but not CTLA-4, and are able to exert antitumor cytotoxicity upon neutralization of PD-1-PD-L1 interaction. CD103 integrin also appeared to promote the recruitment of TIL within epithelial tumor islets, and a strong tumor infiltration with CD103⁺ TIL correlates with NSCLC patient survival. We propose that CD103 integrin can be used as a unique biomarker of tumor-specific CD8⁺ T cells infiltrating human epithelial tumors.

Results

Phenotypic and transcriptional profiles of human NSCLC TIL

So far, little was known about the phenotypic and functional features of human CD103⁺ TIL and their role in controlling epithelial tumor progression. Initial experiments were therefore conducted to define the immune cell subsets expressing the CD103 integrin in human NSCLC TIL. Immunofluorescence analyses indicated that more than 80% of CD103⁺ cells were CD3⁺ T lymphocytes and less than 20% were CD11c⁺/CD83⁺ DC (Fig. 1A). Moreover, most of CD3⁺/CD103⁺ T lymphocytes were CD8⁺ (Fig. 1B). Indeed, 8 to 53% (mean 27 ± 13 , n=21) of CD8⁺ T lymphocytes express CD103, while only 1 to 10% (mean 7 ± 6 , n=21) of CD4⁺ T lymphocytes express the integrin.

We then cell sorted TIL from 13 independent NSCLC specimens, which include up to 85% (mean 82 ± 5 , n=13) of CD3⁺ T cells (Supplementary Fig. 1A), and compared their transcriptional profiles to peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 19 independent NSCLC patients by microarray analysis using the Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K microarray (AMADID 28004). A differential gene expression analyses performed with a p-value $\leq 10^{-10}$ and a fold-change (FC) ≥ 2 identified 487 genes, 233 genes that were less strongly expressed in TIL than in PBMC, and 254 genes that were more strongly expressed in TIL than PBMC (Supplementary Fig. 1B). Further filtering, acquired with an overall TIL signal intensity $\geq 1,000$, identified an expression profile of 103 genes (Supplementary Fig. 1C), including a cluster of 33 genes related to adhesion, exhaustion, activation, immunosuppression and apoptosis, which were more strongly expressed in TIL than in PBMC (Table I). Gene expression profile also includes a cluster of 70 genes, which were in the contrary less strongly expressed in TIL than in PBMC (Supplementary Table I). Among adhesion and exhaustion, *RGS1*, *RALGDS* and *ITGAE*, and *PDCD1*, *LAG-3*, *CTLA-4*,

TNFRSF-18 and *HAVCR2* were the most overexpressed genes in TIL, respectively (Table I). These results were further confirmed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses (Supplementary Fig. 2A), which also showed a correlation with Chip expression profiles (Supplementary Fig. 2B). Moreover, qRT-PCR indicated that *PDCD1*, *CTLA4* and *HAVCR2* genes, encoding PD-1, CTLA-4 and Tim-3, respectively, as well as *RGS1*, *HSPA1A*, *ICOS*, *NR4A2*, *EGR1* and *BAG-3*, also described as markers of T_{RM} T cells (Wakim, Woodward-Davis et al. 2012; Mackay, Rahimpour et al. 2013), were more strongly expressed in CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL subpopulation, isolated from 10 NSCLC, than in patient PBMC (Supplementary Fig. 2C). In contrast, *SIP1* was less strongly expressed in CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL than in PBMC. These results indicate that lung TIL often include a large subset of CD8⁺/CD103⁺ T cells and suggest that, along with CD103 expression, this T-cell subpopulation exhibits T_{RM} features.

CD8⁺/CD103⁺ T cells display a T_{RM} phenotype, co-express PD-1 and Tim-3 and correspond to a highly activated subpopulation

To further characterize the CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL subset we performed multicolor immunofluorescent staining. Flow cytometry analyses showed a homogeneous T-cell subpopulation with a CD69⁺/CD62L⁺/CD28⁺/CD27⁺/CD45RA⁺/CD45RO⁺/CCR7⁺ phenotype characteristic of memory CD8⁺ T lymphocytes. Results also indicated that these CD8⁺/CD103⁺ T cells express chemokine receptors CCR5 and CCR6 (Fig. 2A), and the prosurvival family member Bcl-2, but not KLRG1 and only low levels of CD127 (Supplementary Fig. 3A). Remarkably, while CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL express high levels of PD-1 and Tim-3, only a small subset of CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL express these inhibitory receptors, and CTLA-4 is slightly expressed by both T-cell subpopulations (Fig. 2B).

Moreover, most CD8⁺/CD103⁺ T cells co-express PD-1 and Tim-3, while CD103⁻ T cells were mostly PD-1⁻/Tim-3⁻ (Fig. 2C).

Next, we compared the activation status of CD8⁺/CD103⁺ and CD8⁺/CD103⁻ T cells, and the influence of PD-1 and Tim-3 on T-cell susceptibility to activation-induced cell death (AICD). For this purpose, freshly size-selected TIL were stimulated for 4 h with cell sorted autologous tumor cells, which include 93 ± 3% of major histocompatibility complex class I (MHC-I)⁺, 85 ± 5% of EpCAM⁺ and 70 ± 21% of E-cadherin⁺ cells (Supplementary Fig. 3B), and CD3⁺/CD8⁺ lymphocytes were gated and analyzed for CD103, annexin V and propidium iodide (PI) staining. As shown in Fig. 3A, annexin V⁺/PI⁺ apoptotic cells comprised 19, 17 and 33% of CD103⁺ T cells from patients 97, 98 and 99, while it comprised only 4, 1 and 6% of CD103⁻ T cells, respectively. Higher susceptibility of CD103⁺ T cells to TCR activation-dependent apoptosis was further confirmed in TIL from 2 additional patients (Fig. 3A, right panel). Because PD-1 was associated with higher sensitivity of CD8⁺ T cells to apoptosis (Blackburn, Shin et al. 2008), we examined whether its expression on CD103⁺ T cells was the primary cause of T-cell sensitivity to AICD. Therefore, tumor cell-induced T-lymphocyte apoptosis was assessed in the absence or presence of anti-PD-1 neutralizing monoclonal antibodies (mAb) associated or not with anti-Tim-3. Initial studies indicated that a large proportion of EpCAM⁺/MHC-I⁺ epithelial tumor cells expressed CD103, PD-1 and Tim-3 ligands, E-cadherin, PD-L1 and Galectin-9, respectively (Fig. 3B). Data shown in Fig. 3C indicate that PD-1 ligation, associated or not with anti-Tim-3 blocking mAb, slightly inhibited T-cell AICD, while anti-Tim-3 alone had only a marginal effect. Together, these results further support the hypothesis that CD8⁺/CD103⁺ TIL belongs to a T_{RM} T-cell subset and that they are rapidly activated following *ex vivo* stimulation with autologous tumor cells.

CD8⁺/CD103⁺ TIL recognize and kill autologous tumor cells in the presence of neutralizing anti-PD-1(-L1) mAb

The above results suggested that the CD8⁺/CD103⁺ TIL subpopulation is enriched with tumor-reactive T lymphocytes. To test this hypothesis, we examined whether CD8⁺/CD103⁺ T cells recognize specifically autologous tumor cells. For this end, size-selected freshly isolated TIL were analyzed for their capacity to degranulate after stimulation with cell sorted tumor targets. Results indicated that CD8⁺/CD103⁺ T cells surface expressed much higher levels of CD107a molecule than CD8⁺/CD103⁻ T cells following *ex vivo* stimulation with autologous tumor cells in the presence of low doses (5-10 U/mL) of recombinant (r)IL-2 (Fig. 4A). Moreover, anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 neutralizing mAb significantly enhanced CD107a expression on CD8⁺/CD103⁺ T-cell surface (Fig. 4B).

We then examined granzyme B expression in CD8⁺/CD103⁺ and CD8⁺/CD103⁻ T cells unstimulated or stimulated with low concentrations of rIL-2 (10 U/mL). Intracytoplasmic immunofluorescence analyses indicated that unstimulated CD8⁺ T-cell subsets do not express granzyme B, but stimulation of size-selected freshly isolated TIL for 18 h with rIL-2 induced a much higher increase of the serine protease expression in CD103⁺ than in CD103⁻ T cells (Fig. 4C). To assess whether CD8⁺/CD103⁺/granzyme B⁺ T cells are functional and able to specifically recognize and kill autologous size-selected tumors cells, we performed chromium release assay in the absence or presence of neutralizing anti-PD-1 mAb combined or not with anti-PD-L1. Results included in Fig. 4D show that TIL, previously stimulated with low doses of rIL-2 (5 U/mL), displayed a weak cytotoxic activity toward autologous tumor cells. However, blocking of PD-1 or PD-L1 checkpoint receptors with neutralizing mAb induced a high increase of target cell lysis. Moreover, anti-MHC-I (Fig. 4E) and anti-CD103 (Fig. 4F)

blocking mAb strongly inhibited tumor cell killing by autologous TIL pretreated with anti-PD-1 and/or in the presence of anti-PD-L1 neutralizing mAb, respectively. These results further emphasize that CD8⁺/CD103⁺ lung TIL are exhausted tumor-specific T lymphocytes and that a subset is rescuable by blocking PD-1 signals leading to T-cell activation and autologous tumor cell lysis.

CD103⁺ TIL are associated with increased survival of primary stage I NSCLC patients

Next, we asked whether CD103⁺ TIL are involved in *in situ* antitumor CD8 T-cell immunity. To exert their lytic function, CTL must infiltrate the tumor tissue and then interact with the target cell to finally trigger their functional activities. Thus, we first investigated the frequency and distribution of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ TIL in epithelial tumor and stromal regions from tumor samples of 101 stage I NSCLC patients. Serial tumor sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), anti-CD3, anti-CD8 or anti-CD103 mAb, and intratumoral and stromal cell localization was then quantified (Fig. 5A). Results indicated that the density of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ lymphocytes varied from one tumor to another with a median range of 234 (5-1184), 135 (8-685) and 113 (2-697) infiltration, respectively. Moreover, results showed that the large majority of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ lymphocytes was located within the stroma (Fig. 5B and C). Indeed 89%, 83% and 66% of patients had more than the half of anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD103-stained cells in the stroma, respectively ($p < 0.002$). Increased intraepithelial lymphocyte infiltration was particularly obvious in tumors with high density of CD103⁺ TIL infiltration, which was less present in older patients ($p = 0.02$) and in women as compared to men ($p = 0.01$). Moreover, intraepithelial CD103⁺ lymphocyte infiltration was more present in the ever-smokers as these are males in their majority ($p = 0.01$; see Table II). This later result was also observed for CD8⁺ TIL

infiltration ($p=0.04$), which could also express CD103. In contrast, CD3⁺ lymphocytes were not associated with any of the patients' clinical information.

We then assessed whether a high density of CD103⁺ TIL correlated with a favorable clinical outcome. The median follow-up was of 6.3 years. Results revealed that CD103⁺ TIL significantly correlated with favorable clinical outcome as continuous variable to disease free survival (DFS) and overall survival (OS) in univariate analysis (Table III). For each 50 CD103⁺ increment, the risk of relapse or death was reduced by 16% (unadjusted Hazard Ratio (HR) 0.84, 95% confidence interval (CI) 0.74-0.96, $p=0.01$) and a 12% reduction in the risk of death (unadjusted HR 0.88, 95% CI 0.77-0.99; $p=0.04$). Notably, age, stage and histology at diagnosis were also significantly associated with patients' outcomes, while for gender, trend to a significant association was observed. A multivariate analysis was then carried out including these four factors together with CD103⁺ TIL. As summarized in Table III, CD103⁺ lymphocytes maintained a strong prognostic value in the multivariate model for DFS, but not for the OS (HR 0.85, 95% CI 0.74–0.97, $P=0.02$ and HR 0.89, 95% CI 0.78–1.02, $P=0.09$ for DFS and OS, respectively). Notably, none of the other parameters that were independent predictors of outcome remained significantly associated with DFS (Supplementary Table II). Similar results were obtained when we analyzed the association of CD103⁺ TIL in tumor regions with patient OS outcomes (Table III and Supplementary Table III). With regard to CD8⁺ TIL, no correlation with OS was found. However, association with DFS was observed in the univariate analyses only for either CD8⁺ total or for CD8⁺ lymphocytes within tumor islets (Table III and Supplementary Table II). CD8⁺ TIL within epithelial tumor regions remained significantly associated with DFS in the multivariate analysis (Table III). In contrast, the CD3 T-cell marker was not associated with any of the patient outcomes. Overall

these results indicate that CD103 promotes T-cell infiltration within epithelial tumor islets and that a high density of CD103⁺ TIL is associated with stage I NSCLC patient survival.

Discussion

In this report we show that NSCLC TIL include a homogeneous CD8⁺ T-cell population that displays a phenotypic signature associated with T_{RM} cells, mainly expression of CD103 and CD69 and absence of CCR7. CD103 integrin plays an essential role in retention of T_{RM} in epithelial tissues via interaction with E-cadherin(Zhang and Bevan 2013). Moreover, accumulating evidence indicated that TGF- β 1 plays an essential role in the formation and maintenance of gut T_{RM} through, at least in part, the induction of CD103 and CD69. Although the natural ligand for CD69 has not been clearly defined(Kovalova, Ledvina et al. 2010), evidence for interaction of CD69 with SIP1, a receptor for sphingosine 1-phosphate which mediates the egress of T cells from lymphoid organs(Cyster and Schwab 2012), has been suggested to also play a role in retention of T_{RM} by modulating their capacity to exit non-lymphoid tissues(Cauley and Lefrancois 2013). Accordingly, a downregulation of SIP1 has been observed in CD103⁺/CD8⁺ T_{RM} of the skin(Mackay, Rahimpour et al. 2013) and appeared to be required for their retention in peripheral tissues(Skon, Lee et al. 2013). Here, microarray and qRT-PCR analyses revealed that CD103⁺ NSCLC TIL display a transcriptomic signature characteristic of T_{RM} cells with a downregulation of *SIP1* and upregulation of *RGS1* and *ICOS* as well as genes encoding checkpoint receptors such as PD-1 and Tim-3, along with Bag-3 and the transcription factors EGR1 and Nr4a2(Wakim, Woodward-Davis et al. 2012; Mackay, Rahimpour et al. 2013). RGS1 is a G-protein-coupled inhibitor(Druey, Blumer et al. 1996), which was also associated with tissue retention and as a marker of skin T_{RM} during HSV infection(Mackay, Rahimpour et al. 2013). Notably, our microarray studies also showed a downregulation of *ITGB2* gene in TIL (Supplementary Table I), suggesting that dampening of the $\alpha_L\beta_2$ integrin (LFA-1), most likely through TGF- β 1 secretion within the tumor, also participates in T-cell residency at the tumor site.

T_{RM} are highly activated memory T lymphocytes that reside within a variety of peripheral tissues including intestine(Masopust, Choo et al. 2010 ; Zhang and Bevan 2013), brain(Wakim, Woodward-Davis et al. 2010), skin(Gebhardt and Carbone 2009; Jiang, Clark et al. 2012), tonsil(Woodberry, Suscovich et al. 2005) and lung(Piet, de Bree et al. 2011), and do not return to the circulation following viral clearance(Mackay, Stock et al. 2012). Direct evidence that T_{RM} have a role in antiviral protective immunity in peripheral tissues comes from vaccinia virus studies demonstrating that specific CD8⁺/CD103⁺ T lymphocytes are sufficient to prevent a local infection(Jiang, Clark et al. 2012). This non-circulating T-cell subset could persistently reside in nonlymphoid tissue lesions and provide early responses to reinfection. Emerging evidence also pointed to a role for CD8⁺/CD103⁺ T cells in transplant rejection and in providing protection to prevalent infections post-transplantation(Turner, Gordon et al. 2014). Indeed, CD8⁺/CD103⁺ T cells have been described to promote tubular injury following allogeneic renal transplantation and destruction of pancreatic islet allografts and host intestinal epithelium during graft-versus-host disease (GvHD)(Feng, Wang et al. 2002; El-Asady, Yuan et al. 2005). In the present study, we show that CD8⁺/CD103⁺ TIL are closely related to T_{RM} T cells and are able to mediate tumor-specific cytotoxic response toward autologous malignant cells after *ex vivo* stimulation with low doses rIL-2 and blockade of the immune checkpoint receptor PD-1. These results further support the notion that CD103 is induced on tumor-specific T cells upon entry into a TGF-β1-rich tumor microenvironment and interaction of TCR with specific tumor peptide-MHC-I complex(Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). Persistent tumor antigen stimulation together with TGF-β1 secretion are likely required for maintaining high expression levels of CD103 on TIL. Indeed, our *in vitro* studies with CD8⁺/CD103⁺ TIL clones(Le Floc'h, Jalil et al. 2007) indicated that frequent stimulation with autologous tumor antigen-expressing feeder cells is required to maintain high surface expression levels of CD103 and that supply of

exogenous rTGF- β 1 is sufficient for its upregulation (unpublished data). Accordantly, CD103 was maintained on vesicular stomatitis virus-specific CD8⁺ T cells only as long as the antigen is present(Wakim, Woodward-Davis et al. 2010). Moreover, influenza virus-specific T lymphocytes, but not Epstein-Barr virus and cytomegalovirus-specific T lymphocytes, express the integrin, further emphasizing that a sufficient antigen amount is needed in order to maintain CD103 expression(Piet, de Bree et al. 2011).

Immune checkpoints are important for maintaining self-tolerance and regulating immune responses in peripheral tissues(Pardoll 2012). Among these inhibitory receptors, CTLA-4, PD-1 and Tim-3 appeared to be associated with T-cell exhaustion in chronic viral infections(Freeman, Wherry et al. 2006; Petrovas, Casazza et al. 2006; Trautmann, Janbazian et al. 2006; Kaufmann, Kavanagh et al. 2007; Blackburn, Shin et al. 2008; Zinselmeyer, Heydari et al. 2013) and tumor progression(Fourcade, Sun et al. 2010). Exhausted CD8⁺ T cells frequently coexpress PD-1 and Tim-3, and triggering of both molecules has been reported to transmit a death signal in T cells(Jones, Ndhlovu et al. 2008; Sakuishi, Apetoh et al. 2010). It has also been suggested that tumor cells use PD-1/PD-L1 pathway to escape from the CD8⁺ T-cell immunity by inducing T-cell apoptosis(Dong, Strome et al. 2002). Our data indicate that CD103⁺ TIL frequently coexpress PD-1 and Tim-3, and that this T-cell subset is much more highly susceptible to AICD than CD103⁻ T cells. Moreover, anti-PD1 neutralizing mAb slightly inhibited tumor cell-induced T-cell apoptosis and promotes both CD107a T-cell surface expression and tumor cell killing by autologous *ex vivo* rIL-2-stimulated TIL. These results further support the conclusion that CD103⁺ TIL correspond to an activated CD8⁺ T-cell subpopulation, and that blocking PD-1-PD-L1 interactions enhances antitumor effector functions. It is now admitted that binding of PD-1, frequently upregulated on tumor-specific T cells, to its ligand PD-L1 (B7-H1) on malignant cells results in inhibition of T-lymphocyte

activation(Sakuishi, Apetoh et al. 2010). Targeting PD-1-PD-L1 pathway to enhance antitumor immunity is supported by the recent success of anti-PD-1 and PD-L1-based cancer immunotherapy in patients with various types of advanced solid tumors, including NSCLC(Topalian, Hodi et al. 2012; Champiat, Ileana et al. 2014).

We have previously reported that TIL entry to the tumor site requires, at least in part, expression of the chemokine receptor CCR5, and that CCR6 is induced within the tumor, and likely participates in intratumoral T-cell migration(Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). Here, we show that freshly isolated TIL also express high levels of CCR5 and CCR6 suggesting that they may be involved in the formation of CD8⁺/CD103⁺ T_{RM} within human lung tumors. This is consistent with our previous published findings demonstrating that CD103-mediated recruitment of CCR5 at the immune synapse between TIL and specific cancer cells contributes, at least in part, to T-cell retention within the tumor by inhibiting lymphocyte responsiveness to CCL5(Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). The CCR5 ligand CCL5 was one of the major chemokines involved in regulating antitumor immune responses(Mule, Custer et al. 1996). Increased levels of CCR5 ligands have been demonstrated to improve antitumor functions by inducing effector T-cell infiltration(Uekusa, Yu et al. 2002). Indeed, intratumoral production of CCL5 and CCL3 was described to promote recruitment of CD8⁺ T cells and thereby CTL-dependent control of tumor progression(Johrer, Pleyer et al. 2008). Moreover, CCR5 deficiency was correlated with reduced CD8⁺ T-cell infiltration, poor prognosis in colorectal(Zimmermann, Moehler et al. 2010) and breast(Manes, Mira et al. 2003) cancers, and reduced efficacy of immunotherapy in patients with melanoma(Ugurel, Schrama et al. 2008).

In our series of NSCLC early stage patients, the density of CD103⁺ cells ranged from 2 to 697 per mm² of tumor area. The essential cause of this variation is not clearly understood, but it may reflect inter-patient variations in the intratumoral level of TGF-β1 or factors involved in its activation such as α_v integrins(Munger, Huang et al. 1999; Henderson NC1 2013), the number of tumor antigen specific T-cell precursors or both parameters. Indeed, as mentioned above, engagement of both TGF-β1 receptor (TGF-β1R) and TCR via an active form of TGF-β1 and tumor peptide-MHC-I complex, respectively, is required for CD103 induction(Mokrani, Klibi et al. 2014). Thus, TGF-β1, rather considered as an immunosuppressive cytokine, can control immune responses against viral infections and tumors via induction of CD103 and formation of CD8⁺/CD103⁺ T_{RM}. The CD103⁺ lymphocytes observed in several NSCLC might represent either non-specific T cells passing through the lung tumor lesion or recently recruited tumor-specific T cells that did not yet express the integrin. Indeed, a prolonged period (8-10 days) of residency of human TIL within the cognate tumor, engrafted in immunodeficient mice, was needed for CD103 induction on adoptively transferred tumor-specific T cells(Franciszkiwicz, Le Floch'h et al. 2009). The notion that CD103 is a marker of antigen-reactive T lymphocytes is further supported by studies of antiviral and antitumor CTL responses where CD103 is expressed on CD8⁺ T cells specific for influenza virus in the lung(Piet, de Bree et al. 2011), EBV in the tonsil(Woodberry, Suscovich et al. 2005) and cancer-testis antigen NY-ESO-1 in ovarian cancer(Webb, Wick et al. 2010). In the latter report as well as in the present study, CD103⁺ T cells express high levels of PD-1, which has been defined as a biomarker of tumor-specific T cells(Gros, Robbins et al. 2014). More importantly, we show here a correlation between a dense tumor infiltration by CD103⁺ TIL, without the need to discriminate their location in epithelial versus stromal regions, and NSCLC patients' DFS. Similar results were obtained in high-grade serous ovarian cancer, and CD103 expression on TIL was also associated with

increased patient survival(Webb, Milne et al. 2014). These results suggest that CD103 alone may be used as a prognostic biomarker in epithelial tumors. Conversely, no correlation between total CD8⁺ TIL and patient survival was observed unless they are located in intraepithelial tumor regions, in which case improved DFS outcome is observed. Thus, CD103 identifies a subpopulation of CD8⁺ T cells that is more predictive of patient outcome, and this integrin is likely involved, at least in part, in the recruitment of CTL within tumor islets. Our data also indicate that CD103 delineates a highly activated tumor-specific T-cell subset that is able to kill malignant cells upon neutralization of the immune checkpoint receptor PD-1 suggesting that it may also be used as a predictive marker of response to anti-PD-1/PD-L1-based immunotherapy.

Overall, our results demonstrate a major role for CD8⁺/CD103⁺ T cells infiltrating human epithelial tumor lesions in antitumor immune response and identify CD103 integrin as a biomarker of tumor-reactive CD8⁺ TIL. Thus, investigating freshly isolated patient TIL contributes not only to our understanding of the local tumor-specific CTL function in NSCLC, but may also provide insights into the role of T_{RM} T-cell populations in cancer immunotherapy. Indeed, by characterizing T_{RM} TIL and identifying the mechanisms involved in their retention within the tumor ecosystem and tumor-induced dysfunctions, we hope that the manipulation of this tumor-specific T-cell subset will permit to enhance immune protection and improve current cancer immunotherapy approaches.

Materials and Methods

TIL and patient PBMC

Fresh NSCLC tumors (129 patients) were obtained from the Institut Mutualiste Montsouris (Paris, France) or Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France) and immediately dissociated mechanically and enzymatically (Lung Dissociation Kit, Miltenyi Biotec). TIL were then either directly analyzed by multicolor flow cytometry or isolated using a FACS ARIA cell sorter based on a small-size selection of mononuclear cells.

PBMC from NSCLC patients were obtained from Gustave Roussy Institute.

All experiments were approved by the Institutional Review Board of Gustave Roussy.

Microarray assay

Total RNA from small-size-selected TIL and patient PBMC were extracted using TRIzol (Sigma-Aldrich) and then compared using Agilent one color microarray technology. Probe synthesis and labeling were performed by Agilent's low fluorescent low input linear amplification kit (Agilent). Hybridization was performed on the human whole genome SurePrint G3 GE 8 x 60 K microarray (AMADID 28004) using reagents and protocols provided by the manufacturer. Feature extraction software, provided by Agilent (Version 10.7.3.1), was used to quantify the intensity of fluorescent images. Data were normalized by a quantile method from LIMMA Bioconductor R package. Differential gene expression analysis was performed with LIMMA's moderated T-test. Primary functional analyses were performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and DAVID Bioinformatics (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v6.7).

Quantitative RT-PCR analysis

cDNA were synthesized from 1 µg of mRNA from small-size-selected TIL, patient PBMC or CD103⁺ TIL using an Applied Biosystems kit. Real-time (RT)-PCR analysis was performed using a LightCycler and the LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science). Specificity of PCR amplicons was confirmed by melting curve analysis. Expression of target genes was normalized to that of 18S. Relative expression of tested genes was calculated using the target threshold cycle value (Ct) and the $2^{-\Delta Ct}$ method. For each gene, values were averaged over three independent measurements and the relative transcript level was calculated.

Antibodies and immunofluorescence analyses

Anti-human CD3, CD8, CD4, CD103, CD107a, CD127, Bcl-2, KLRG1 and granzyme B mAb as well as mouse and rabbit isotopic controls were purchased from Ozyme. Anti-human CD69, CD62L, CD45RA, CD45RO, CD27 and CD28 mAb were provided by Invitrogen. Anti-human PD-1, Tim-3 and CTLA-4 mAb were purchased from eBioscience. For intracytoplasmic granzyme B and Bcl-2 expression, TIL were fixed using PBS containing 2% formaldehyde, and cell membrane was then permeabilized using PBS supplemented with 0.5% BSA and 0.2% saponin. Phenotypic analyses of T lymphocytes were performed by direct immunofluorescence using a FACS LSRII flow cytometer. Data were processed using Flowjo or Diva software (BD Biosciences).

Apoptosis assay

AICD was measured by flow cytometry using an annexin-V apoptosis detection kit (BD pharmingen). After recovery of TIL (small cells) and tumor (large) cells by FACS cell sorting based on a cell size selection, they were either kept in medium or stimulated overnight with

rIL-2 (5-10 U/mL), or kept in medium alone, respectively. TIL were preincubated for 1 h at 37°C with neutralizing anti-PD-1, anti-Tim-3, a combination of both mAb or IgG1 control, and then cultured for 4 additional hours in the presence of autologous tumor cells. After 15 min incubation with 5 µl annexin-V labeling buffer and 5 µl propidium iodide (PI), cells were analyzed within 1 h by a FACS LSRII flow cytometer. For detection of apoptotic TIL, CD8⁺/CD103⁺ or CD8⁺/CD103⁻ cells were gated and then analyzed for annexin V and PI labeling.

Cytotoxicity assay

The cytotoxic activity of freshly isolated TIL was measured by a conventional 4 h ⁵¹Cr-release assay as described (Le Floch, Jalil et al. 2007). Briefly, after recovery of TIL and tumor cells by FACS cell sorting, TIL were either kept in medium or stimulated overnight with rIL-2 (5 U/mL) and tumor cells were kept in medium alone. Autologous tumor cells were used as targets at a 10:1 E:T ratio. For cytotoxicity induction, TIL or tumor cells were preincubated for 1 h at 37°C with neutralizing anti-PD-1 or anti-PD-L1 mAb, respectively. Cytotoxicity inhibition was performed by preincubating effector or target cells for 1 h with anti-CD103 or anti-MHC-I (W6/32) blocking mAb, respectively. IgG1 were used as negative controls. Percent specific lysis was calculated conventionally (Le Floch, Jalil et al. 2007).

NSCLC patient cohort

Paraffin-embedded primary tumor samples were obtained from patients diagnosed with early-stage NSCLC and who underwent curatively intended surgical resection at Institut Mutualiste Montsouris between 1995 and 2002. A total of 101 tumor samples were included in this study and analyzed for CD3, CD8 and CD103 expression on TIL, located either in epithelial or stromal regions, and their association with patients' survival outcomes. All were with pathological stage I (33.7% were pT1N0 and 66.3% pT2N0) and none of them had received

neoadjuvant therapy at the time of surgery. 44.5% were adenocarcinomas (ADC), 42.6% squamous cell carcinomas (SCC), 12.9% were mixed or large cell carcinoma (LCC) and 3% other types. Median (range) age at diagnosis was 66.1 years (40.5 to 83.6 years old); 68.3% of the patients were males; 89.1% were tobacco users, and median (range) tobacco consumption was 50 (5-100) pack years. All patients signed a consent form, in compliance with the national legislation and the local ethics committee.

Immunohistochemical staining

Serial sections from paraffin-embedded lung cancer specimens were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES), anti-CD3, anti-CD8 (Thermo Fisher) or anti-CD103 mAb (Abcam). Briefly, 4- μ m thick whole sections from formalin-fixed paraffin-embedded lung cancer specimens were mounted on poly-l-lysine-coated slides, deparaffinized and rehydrated through graded alcohols to water. Antigen retrieval was performed in a citrate buffer (pH=6) during 30 min in a 98°C water bath. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 3% hydrogen peroxidase (Sigma-Aldrich) for 10 min and nonspecific protein were blocked for 15 min (BSA 1% in PBS 1x). The primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. Immunostaining was visualized following incubation with goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) during 30 min at room temperature and then adding 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate (Powersvision, Leica). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin (VWR). Negative controls were performed by substituting primary antibody with isotype rabbit IgG controls. For all staining, whole slides were digitized using a slide scanner (VS120, Olympus). For each slide, 3 areas of 0.88 mm² were selected by a pathologist to be representative of the potential heterogeneity of immune infiltration within the tumor. The quantification of the number of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ cells was performed manually in each of the areas on serial sections for both intraepithelial and stromal

compartments. For each slide, the data were summarized over the three areas giving a score number of stained cells per mm².

Statistical analysis

Distributions of CD3, CD8 and CD103 biomarkers according to each clinical factor (age, histological type, pathological stage smoking status and gender) were described each apart by providing medians and ranges, and comparisons of distribution between groups were performed using Wilcoxon rank or Kruskal Wallis test when appropriate. DFS was defined by the time from diagnosis to death or relapse (local or distant), whatever occurs first, or to last follow-up (LFU) date. OS was defined as the time from diagnosis to death or date of LFU. Considering CD3, CD8 and CD103 as continuous variables, their association with DFS and OS was evaluated using univariate and multivariate cox regression models adjusting on age, histological type, gender, stage and smoking status. The required assumptions of proportionality in the multivariate survival analysis were checked graphically and by Schoenfeld's test(Schoenfeld 1982). HR and their 95% CI were provided.

For all the other experiments, data were compared using the two-tailed Student's t-test. Two groups were considered as significantly different if $p < 0.05$.

Acknowledgments

We thank Yann Lecluse and Philippe Rameau for their help with FACS analyses. We also thank Olivia Bawa for her help with immunohistochemistry staining and Stéphanie Corgnac for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants from the INSERM, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue contre le cancer and the SIRIC SOCRATE (INCa-DGOS-Inserm 6043).

FD was supported by the Cancéropôle Ile de France and the University Paris-Sud. JA was supported by the Institut Thématique Multi-Organismes Cancer and the INCa.

References

1. Bossi, G. et al. The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol Rev* 189, 152-160 (2002).
2. Anikeeva, N. et al. Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 6437-6442 (2005).
3. Le Floch, A. et al. Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J. Exp. Med* 204, 559-570 (2007).
4. Kilshaw, P.J. & Murant, S.J. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 20, 2201-2207 (1990).
5. Sung, S.S. et al. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176, 2161-2172 (2006).
6. Annacker, O. et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med* 202, 1051-1061 (2005).
7. French, J.J. et al. T cell adhesion and cytolysis of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy? *Br J Cancer* 87, 1034-1041 (2002).
8. Quinn, E., Hawkins, N., Yip, Y.L., Suter, C. & Ward, R. CD103+ intraepithelial lymphocytes-a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 39, 469-475 (2003).
9. Webb, J.R. et al. Profound elevation of CD8+ T cells expressing the intraepithelial lymphocyte marker CD103 (alphaE/beta7 Integrin) in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 118, 228-236 (2010).
10. Mokrani, M., Klibi, J., Bluteau, D., Bismuth, G. & Mami-Chouaib, F. Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 192, 2471-2479 (2014).
11. Franciszkiwicz, K. et al. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res* 73, 617-628 (2013).
12. Le Floch, A. et al. Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway. *Cancer Res* 71, 328-338 (2011).
13. Gofu, G., Rivera-Nieves, J. & Ley, K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med* 9, 836-850 (2009).
14. Zhang, N. & Bevan, M.J. Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention. *Immunity* 39, 687-696 (2013).
15. Mackay, L.K. et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol* 14, 1294-1301 (2013).
16. Wakim, L.M. et al. The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain. *J Immunol* 189, 3462-3471 (2012).

17. Blackburn, S.D., Shin, H., Freeman, G.J. & Wherry, E.J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 15016-15021 (2008).
18. Kovalova, A. et al. Synthetic N-acetyl-D-glucosamine based fully branched tetrasaccharide, a mimetic of the endogenous ligand for CD69, activates CD69+ killer lymphocytes upon dimerization via a hydrophilic flexible linker. *J. Med. Chem* 53, 4050-4065 (2010).
19. Cyster, J.G. & Schwab, S.R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol* 30, 69-94 (2012).
20. Cauley, L.S. & Lefrancois, L. Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells. *Mucosal Immunol* 6, 14-23 (2013).
21. Skon, C.N. et al. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 14, 1285-1293 (2013).
22. Druey, K.M., Blumer, K.J., Kang, V.H. & Kehrl, J.H. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 379, 742-746 (1996).
23. Masopust, D. et al. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J. Exp. Med* 207, 553-564 (2010).
24. Wakim, L.M., Woodward-Davis, A. & Bevan, M.J. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107, 17872-17879 (2010).
25. Gebhardt, T. & Carbone, F.R. Immunology: A helpers' guide to infection. *Nature* 462, 418-419 (2009).
26. Jiang, X. et al. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature* 483, 227-231 (2012).
27. Woodberry, T. et al. Alpha E beta 7 (CD103) expression identifies a highly active, tonsil-resident effector-memory CTL population. *J Immunol* 175, 4355-4362 (2005).
28. Piet, B. et al. CD8(+) T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung. *J Clin Invest* 121, 2254-2263 (2011).
29. Mackay, L.K. et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 109, 7037-7042 (2012).
30. Turner, D.L., Gordon, C.L. & Farber, D.L. Tissue-resident T cells, in situ immunity and transplantation. *Immunol Rev* 258, 150-166 (2014).
31. Feng, Y. et al. CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8(+) T cells. *J. Exp. Med* 196, 877-886 (2002).
32. El-Asady, R. et al. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J. Exp. Med* 201, 1647-1657 (2005).
33. Franciszewicz, K. et al. Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention. *Cancer Res* 69, 6249-6255 (2009).
34. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252-264 (2012).

35. Petrovas, C. et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med* 203, 2281-2292 (2006).
36. Kaufmann, D.E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4⁺ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat Immunol* 8, 1246-1254 (2007).
37. Trautmann, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12, 1198-1202 (2006).
38. Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Sharpe, A.H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J. Exp. Med* 203, 2223-2227 (2006).
39. Zinselmeyer, B.H. et al. PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *J. Exp. Med* 210, 757-774 (2013).
40. Fourcade, J. et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med* 207, 2175-2186 (2010).
41. Jones, R.B. et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med* 205, 2763-2779 (2008).
42. Sakuishi, K. et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med* 207, 2187-2194 (2010).
43. Dong, H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800 (2002).
44. Topalian, S.L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med* 366, 2443-2454 (2012).
45. Champiat, S. et al. Incorporating immune-checkpoint inhibitors into systemic therapy of NSCLC. *J Thorac Oncol*, 144-153 (2014).
46. Mule, J.J. et al. RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations. *Hum Gene Ther* 7, 1545-1553 (1996).
47. Uekusa, Y. et al. A pivotal role for CC chemokine receptor 5 in T-cell migration to tumor sites induced by interleukin 12 treatment in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 62, 3751-3758 (2002).
48. Johrer, K. et al. Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines. *Expert Opin Biol Ther* 8, 269-290 (2008).
49. Zimmermann, T. et al. Low expression of chemokine receptor CCR5 in human colorectal cancer correlates with lymphatic dissemination and reduced CD8⁺ T-cell infiltration. *Int J Colorectal Dis* 25, 417-424 (2010).
50. Manes, S. et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J. Exp. Med* 198, 1381-1389 (2003).
51. Ugurel, S. et al. Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy. *Cancer Immunol Immun* 57, 685-691 (2008).

52. Munger, J.S. et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319-328 (1999).
53. Henderson N.C. et al. Targeting of αv integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* (12):1617-24. (2013).
54. Gros, A. et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 124, 2246-2259 (2014).
55. Webb, J.R., Milne, K., Watson, P., Deleeuw, R.J. & Nelson, B.H. Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 20, 434-444 (2014).
56. Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika* 69:239-241 (1982).

Figure legends

Figure 1

Expression of CD103 integrin on TIL from NSCLC. Freshly resected NSCLC tumors were dissociated and then directly analyzed by flow cytometry for CD103, CD3, CD8, CD4, CD83 and CD11c expression. **A.** Surface expression of CD3 (left panels, black fill), CD11c and CD83 (middle panels) on CD103⁺ TIL. An isotypic control mAb was included (left panels, grey fill). Three independent experiments are shown. *Right panel:* Mean percentages of CD3⁺ T cells and CD11c⁺/CD83⁺ DC among CD103⁺ TIL (n=12). **B.** Surface expression of CD103 on CD8⁺ and CD4⁺ TIL from 3 independent NSCLC. Percentages of positive cells are indicated. Numbers in parentheses correspond to mean fluorescence intensity (MFI). *Right panel:* Mean percentages of CD8⁺/CD103⁺ and CD4⁺/CD103⁺ cells among CD3⁺ T cells (n=21). ***, p < 0.0001. Pt: patient.

Figure 2

Characterization of T-cell surface markers of CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL. **A.** TIL from freshly isolated NSCLC tumors were analyzed by flow cytometry using indicated mAb (black fill) or corresponding isotypic controls (grey fill). Two representative experiments from 5 are shown. **B.** Surface expression of PD-1, Tim3 and CTLA-4 among CD103⁺ and CD103⁻ TIL. Three representative experiments are included. *Right panel:* Mean percentages of PD-1⁺, Tim-3⁺ and CTLA-4⁺ cells among CD3⁺/CD8⁺ TIL expressing or not CD103 (n=12). **C.** Expression of both PD-1 and Tim-3 on CD3⁺/CD8⁺ TIL, expressing or not CD103. Three representative experiments are shown. Percentage of positive cells and MFI are included. *Right panel:* Mean percentages of PD-1⁺/Tim-3⁺, PD-1⁺/Tim-3⁻, PD-1⁻/Tim-3⁺ or PD-1⁻/Tim-3⁻ among CD3⁺/CD8⁺ T cells, expressing or not CD103 (n=12). *, p < 0.05; ***, p < 0.0001. Pt: patient.

Figure 3

AICD of CD3⁺/CD8⁺ TIL expressing or not CD103. **A.** Percentages of apoptotic cells among CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ and CD3⁺/CD8⁺/CD103⁻ TIL. Size-selected freshly isolated TIL were cultured for 4 h with cell sorted autologous tumor cells, and then analyzed for apoptosis induction by flow cytometry. Surface expression of annexin-V and PI among CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ and CD3⁺/CD8⁺/CD103⁻ TIL from 3 independent NSCLC tumors are included. Annexin-V⁺/PI⁻ apoptotic cells are shown in lower right quadrant. *Right panel:* Mean percentages of annexin-V⁺/PI⁻ apoptotic cells among CD3⁺/CD8⁺ TIL, expressing or not CD103 (n=5). **B.** Expression of CD103, PD-1 and Tim-3 ligands on autologous tumor cells. Expression of E-cadherin, PD-L1 and Galactin-9 on EpCAM⁺/MHC-I⁺ tumor cells isolated from 3 NSCLC. *Right panel:* Mean percentages of E-cadherin⁺, PD-L1⁺ and Galactin-9⁺ cells among EpCAM⁺/MHC-I⁺ tumor cells (n=8). **C.** Rescue of CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL from apoptosis using neutralizing anti-PD-1 mAb. Size-selected TIL were incubated for 1 h at 37°C with anti-PD-1 and/or anti-Tim-3 blocking mAb or an IgG1 negative control, and then cocultured with cell-sorted autologous tumor cells for 4 additional hours. CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ lymphocytes were then analysed for annexin V and PI staining. Percentages of annexin V⁺/PI⁻ apoptotic cells among CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ T cells are shown in lower right quadrant. Three representative experiments are shown. *Right panel:* Mean percentage decrease of annexin-V⁺/PI⁻ apoptotic cells in the presence of indicated mAb (n=5). *, p < 0.05. Pt: patient.

Figure 4

Neutralisation of inhibitory receptors improves reactivation of exhausted CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ TIL. **A.** CD107a induction on CD3⁺/CD8⁺ TIL expressing or not CD103. TIL, cultured in medium or in presence of rIL-2, were stimulated with autologous tumor cells and then

CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ and CD3⁺/CD8⁺/CD103⁻ lymphocytes were analysed for surface expression of CD107a. Two representative experiments are included. *Right panel*: Mean percentages of CD107a⁺ lymphocytes among CD3⁺/CD8⁺ T cells, expressing or not CD103 (n=5). **B.** Increase of CD107a expression on CD8⁺/CD103⁺ TIL in the presence of neutralizing anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 mAb. Five independent experiments are shown. *Right panel*: Mean percentage increase of CD107a⁺ T cells among CD8⁺/CD103⁺ in the presence of indicated mAb (n=5). **C.** Expression of granzyme B (GrzB) in CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ and CD3⁺/CD8⁺/CD103⁻ TIL, unstimulated or stimulated with rIL-2. Two representative experiments are included. *Right panel*: Mean percentages of granzyme B-expressing CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ and CD3⁺/CD8⁺/CD103⁻ lymphocytes (n=3). **D.** Cytotoxic activity of freshly isolated TIL toward autologous tumor cells. TIL were cultured with target cells in the absence or presence of anti-PD-1 and/or anti-PD-L1 mAb, or an IgG1 isotypic control. Two independent experiments are shown. **E.** Inhibition of TIL-mediated cytotoxicity with anti-MHC-I mAb. TIL were preincubated or not with anti-PD-1 blocking mAb and then cultured with autologous tumor cells untreated or pretreated with anti-MHC-I mAb. **F.** Inhibition of TIL-mediated killing with neutralizing anti-CD103 mAb. TIL were preincubated with anti-CD103 mAb and then cultured with target cells pretreated with anti-PD-L1 mAb. *, p < 0.05; **, p < 0.001 and ***, P < 0.0001. Pt: patient.

Figure 5

Distribution of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ cells in intraepithelial tumoral and stromal regions of NSCLC tumors. **A.** Tumor sections from 101 early-stage NSCLC patients were stained with anti-CD3, anti-CD8 or anti-CD103 mAb. Representative images of CD3, CD8 and CD103 immunostaining of the same tumor area and counterstained with HES (X200) are shown. **B.** CD3, CD8 and CD103 expression scatterplots in intraepithelial tumor and stromal

regions among the 101 NSCLC tumors. *Right panels:* Barplots of the total number (blue) and the percentage (yellow) of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ cells that are present in the tumor.

C. Mean percentages of CD3⁺, CD8⁺ and CD103⁺ lymphocytes within tumoral and stromal regions of the 101 NSCLC tumors. **, $p < 0.001$ and ***, $p < 0.0001$.

Supplementary figure legend

Supplementary figure 1

A. Expression of CD3 T-cell marker on TIL isolated from a NSCLC tumor on the basis of a small cell size selection. TIL were analyzed by flow cytometry using anti-CD3 mAb (black fill) or an isotypic control (grey fill). *Right panel:* Mean percentages of CD3⁺ T cells among size-selected TIL, (n=13). **B.** Global gene expression analyses of patient TIL and PBMC. Differential analysis of gene expression profiles in NSCLC patient TIL (13 samples) and PBMC (19 samples) are shown. Genes of interest were selected using a FC > 2 and a p-value $\leq 10^{-10}$ (487 genes). A subset of 103 genes with an intensity higher than 1,000 in TIL samples has been selected for further analysis. **C.** Heatmap of gene expression of the 103-gene subset. Data were bi-clusterized by genes and by samples using a Pearson's coefficient as distance metric and the Ward method for clusterization. The magnitude of relative expression of a particular gene was reflected by use of color representation (LogRatio). Microarray analysis was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and DAVID Bioinformatics.

Supplementary figure 2

Quantitative (q)RT-PCR analyses of selected genes. **A.** qRT-PCR validation of genes differentially expressed in TIL and patient PBMC. The expression of genes differentially expressed in TIL and PBMC from 8 NSCLC patients. **B.** Correlation between microarray analysis and qRT-PCR in 8 patient's TIL and PBMC. **C.** Genes differentially expressed in

CD3⁺/CD8⁺/CD03⁺ TIL, cell sorted from 10 NSCLC with anti-CD103 mAb, and patient PBMC. In bold, genes described as markers of T_{RM} T cells.

Supplementary figure 3

Characterization of freshly size-selected TIL and tumor cells. **A.** Expression of Bcl-2, CD127 and KLRG1 in CD3⁺/CD8⁺/CD103⁺ NSCLC TIL. Flow cytometry analysis of intracytoplasmic (Bcl-2) and surface (CD127 and KLRG1) protein expression was performed using specific antibodies (black fill) or corresponding isotypic controls (grey fill). Two representative experiments are included. **B.** Expression of E-cadherin, MHC-I and EpCAM on cell-sorted tumor cells. Surface expression analysis was performed by flow cytometry using specific mAb. Percentages of positive cells are indicated, MFI are in parentheses. *Right panels:* Mean percentages of E-cadherin⁺ and EpCAM⁺ and MHC-I⁺ cells among large size-selected cells (n=8). Pt: patient.

Table I: Differential gene expression profiles of NSCLC TIL and patient PBMC

Sequence Name	Accession N°	Sequence description	FC	Int TIL	Int PBMC
Adhesion					
<i>RGS1</i>	NM_002922	Regulator of G-protein signaling 1	24	40364	1700
<i>RALGDS</i>	NM_001042368	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	2	2472	1293
<i>ITGAE</i>	NM_002208	Integrin, alpha E (antigen CD103)	2	1132	312
Exhaustion					
<i>PDCD1</i>	NM_005018	Programmed cell death 1	13	7880	620
<i>LAG3</i>	NM_002286	Lymphocyte-activation gene 3	10	9284	890
<i>CTLA4</i>	NM_005214	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	9	3786	428
<i>TNFRSF18</i>	NM_148901	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	8	1465	180
<i>HAVCR2</i>	NM_032782	Hepatitis A virus cellular receptor 2	2	2974	1690
Immunosuppression					
<i>IL-6</i>	NM_000600	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	11	1976	178
<i>IL-21</i>	NM_021803	Interleukin 21 (IL21), transcript variant 1	8	109855	9136
Activation					
<i>TNFRSF9</i>	NM_001561	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	17	1198	70
<i>TNFSF4</i>	NM_003327	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	13	7100	546
<i>ICOS</i>	NM_012092	Inducible T-cell co-stimulator	8	10073	1306
Apoptosis					
<i>HSPA1B</i>	NM_005346	Heat shock 70kDa protein 1B	233	75665	325
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	Heat shock 70kDa protein 1A	110	156625	1416
<i>CYR61</i>	NM_001554	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	27	19617	4852
<i>HSPB1</i>	NM_002156	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	12	5256	1822
<i>GADD45G</i>	NM_006705	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	10	3282	309
<i>BAG-3</i>	NM_004281	BCL2-associated athanogene 3	10	5256	1822
<i>TNFSF9</i>	NM_003811	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	8	1632	199
<i>CCR5</i>	NM_000579	Chemokine (C-C motif) receptor 5	8	7020	910
<i>RASD1</i>	NM_016084	RAS, dexamethasone-induced 1	6	3266	493
<i>BIRC3</i>	NM_001165	Baculoviral IAP repeat containing 3	5	9536	1882
<i>JUN</i>	NM_002228	Jun proto-oncogene	4	10209	2217
<i>EGR1</i>	NM_001964	Early growth response 1	4	19617	4852
<i>BIK</i>	NM_001197	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	3	2974	1687
<i>TNFAIP3</i>	NM_006290	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3	23395	7931
<i>NR4A2</i>	NM_006186	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3	5256	1822
<i>TFRC</i>	NM_003234	Transferrin receptor (p90, CD71)	3	5486	1940
<i>EGR2</i>	NM_000399	Early growth response 2	3	2738	968
<i>SERPINB9</i>	NM_004155	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	2	2948	1109
<i>IFIH1</i>	NM_022168	Interferon induced with helicase C domain 1	2	1712	672
<i>ST6GAL1</i>	NM_173216	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1	2	6789	3307

Gene expression profiles of freshly isolated TIL were compared with those of PBMC from NSCLC patients (p-value < 10^{-10} , Fold change > 2 and intensity expression > 1,000). The selected 33 genes, which were more strongly expressed in TIL than in PBMC, were classified according to their presumed biological functions by ingenuity software (www.ingenuity.com). Int TIL: intensity of transcripts obtained in TIL; Int PBMC: intensity of transcripts obtained in PBMC.

Table II: CD3, CD8 and CD103 TIL association with clinical characteristics in stage I NSCLC patients

		Total			Tumoral		Stromal	
		Number (%)	Median (Q1-Q3)	P-v	Median (Q1 - Q3)	P-v	Median (Q1 - Q3)	P-v
Patients histological types		93	234.7(147.7-442.7)		35.7 (12.3-96.7)		185.7 (127.0-355.3)	
	ADC	42 (45.16)	209.8(151.9-402.0)	0.09	26.7 (7.9-81.5)	0.07	178.7 (132.3-353.9)	0.07
	SCC	40 (43.01)	198.3 (117.6-437.2)		40.8 (16.8-98.8)		158.7 (78.5-325.9)	
	Others	11 (11.83)	474.0 (331.2-598.2)		85.7 (37.5-145.0)		303.7 (247.7-475.7)	
Stage		30 (32.26)	194.3 (159-391.5)	0.45	25.5 (6.2-79.5)	0.06	172.6 (129.5-320.8)	0.69
Stage Ib		63 (67.74)	277.7 (143.8-477.5)		49 (17.5-108.8)		199.7 (118.7-377.7)	
Gender	Female	30 (32.26)	190.5 (137.2-398.4)	0.48	32.2 (8.3-84.8)	0.27	169.8 (96.3-381.2)	0.67
	Male	63 (67.74)	266.3 (151.8-458.3)		39.7 (16.8-110.2)		202.7 (133.7-346.8)	
Smoking status	Ever	83 (89.25)	257.0 (145.8-442.2)	0.92	41 (18.5-103.5)	0.06	185.7 (118.7-352.5)	0.53
	Never	10 (10.75)	202.8 (154.9 - 502.0)		15.2 (1.3-68.2)		178.1 (136.7-429.6)	
Age (years)	<65	63 (62.4)	277.7 (168.3-442.7)	0.07	47.3 (20-106)	0.09	209 (143.3-355.3)	0.16
	≥65	38 (37.6)	187.3 (117.6-439.7)		28 (8.4-87.2)		158.7 (68.0-327.2)	
Patients histological subtypes		98	135.0 (86.8-249.2)		24.3 (7.4-80.1)		106.8 (53.6-169.9)	
	ADC	45 (45.92)	132.0 (83.0-225.7)	0.03	12.3 (2-48.7)	0.02	111.7 (65.7-170.7)	0.01
	SCC	40 (40.82)	115.3 (87.6-247.2)		27.6 (12.5-71.1)		82.7 (46.3-140.9)	
	Others	13 (13.27)	331.3 (124.0-411.7)		85 (27.5-148.7)		173.7 (116.7-263.0)	
Stage		32 (32.65)	124.0 (54.67-248.7)	0.53	16 (4.3-56.8)	0.24	111.5 (53.3-150.9)	0.76
Stage Ib		66 (67.35)	138.7 (91.08-249.3)		27.6 (8.6-80.1)		103.5 (60.9-174.4)	
Gender	Female	31 (31.63)	124.0 (84.17-209.3)	0.50	22.7 (3.2-50.5)	0.18	103.7 (57.4-170.2)	0.87
	Male	67 (68.37)	139.3 (91.5-251.5)		27.5 (7.83-90.5)		107.0 (52.0-168.7)	
Smoking status	Ever	87 (88.78)	139.3 (85.83-255.3)	0.50	27.5 (7.8-87.7)	0.04	106.7 (50.7-170.3)	0.91
	Never	11 (11.22)	124.0 (107-138.8)		8.7 (0-26.5)		108.3 (80.8 -123.5)	
Age (years)	<65	63 (62.4)	144.7 (88.3-311.4)	0.17	27.8 (7.1-113.9)	0.11	111.5 (53.2-174.2)	0.48
	≥65	38 (37.6)	128.0 (82.3-194.6)		18.7 (7.4-52.7)		105.2 (56.5-167.9)	
Patient histological subtypes		98	112.5 (65.7-230.6)		36.8 (15.4-103.9)		70.1 (37.1-135.1)	
	ADC	45 (45.92)	111.2 (63.4-204.3)	0.13	23.9 (1.0-72.0)	0.01	77.1 (48.1-143.93)	0.02
	SCC	40 (40.82)	99.4 (67.0-192.5)		46.0 (24.3-98.0)		46.3 (29.3-85.5)	
	Others	13 (13.27)	264.3 (87.3-374.8)		90 (44-166.1)		155.2 (43.3-181.8)	
Stage		32 (32.65)	107.6 (61.0-203.8)	0.24	29.5 (8.5-95.7)	0.35	61.8 (36.7-104.7)	0.36
Stage Ib		66 (67.35)	127.6 (69.5-250.8)		40.7 (17.0-103.9)		76.4 (37.9-147.0)	
Gender	Female	31 (31.63)	104.1 (63.3-157.9)	0.25	23.9 (7.2-51.9)	0.01	71.3 (39.9-125.2)	0.86
	Male	67 (68.37)	128.2 (67.0-274.2)		55.2 (22.7-146.7)		69.6 (36.5-142.2)	
Smoking status	Ever	87 (88.78)	126.9 (67.0-254.8)	0.12	41.5 (21.0-121.3)	0.01	71.3 (37.4-140.2)	0.34
	Never	11 (11.22)	87.3 (62.4-118.3)		15.7 (0-35.7)		48.1 (32.9-90.6)	
Age (years)	<65	63 (62.4)	136.1 (76.1-273.0)	0.02	51.9 (20.5-160.5)	0.02	81.4 (47.5-144.9)	0.02
	≥65	32 (37.6)	97.4 (52.4-145.7)		26.6 (9.9 – 65.5)		64.1 (28.9-119.6)	

Stage Ia: pT1N0 and stage Ib: pT2N0; Q1 and Q3: the first and the third quartile respectively; P-v: p-value. The p-value was determined using Wilcoxon Rank or Kruskal Wallis test when appropriate.

Table III: Association of CD3, CD8 and CD103 with prognosis in univariate and multivariate (adjusting on age, gender, stage and histology) analyses

			Univariate				Multivariate			
			No. of patients	No. of Events		HR (95% CI) for 50 increase	P-value		HR (95% CI) for 50 increase	P-value
Overall survival	Total	CD3	93	44	0.97	(0.91-1.04)	0.4			
		CD8	98	45	0.90	(0.80-1.02)	0.1			
		CD103	98	45	0.88	(0.77-0.99)	0.04	0.89	(0.78-1.02)	0.09
	Epithelial tumor islets	CD3	93	44	0.94	(0.76-1.15)	0.5			
		CD8	98	45	0.83	(0.63-1.09)	0.2			
		CD103	98	45	0.84	(0.67-1.06)	0.09	0.84	(0.66-1.05)	0.13
	Stromal region	CD3	93	44	0.97	(0.88-1.06)	0.5			
		CD8	98	45	0.88	(0.74-1.05)	0.2			
		CD103	98	45	0.78	(0.62-0.98)	0.03	0.84	(0.67-1.06)	0.14
Disease-free survival	Total	CD3	92	48	0.96	(0.89-1.02)	0.2			
		CD8	97	50	0.88	(0.78-0.99)	0.04	0.89	(0.78-1.02)	0.09
		CD103	97	50	0.84	(0.74-0.96)	0.01	0.85	(0.74-0.97)	0.02
	Epithelial tumor islets	CD3	92	48	0.82	(0.65-1.03)	0.09			
		CD8	97	50	0.72	(0.54-0.96)	0.02	0.70	(0.51-0.97)	0.03
		CD103	97	50	0.78	(0.63-0.96)	0.02	0.76	(0.61-0.96)	0.02
	Stromal region	CD3	92	48	0.96	(0.89-1.05)	0.4			
		CD8	97	50	0.88	(0.74-1.04)	0.1			
		CD103	97	50	0.76	(0.61-0.94)	0.01	0.80	(0.64-1.01)	0.06

No: Number. HR: Hazard Ratio, CI: confidence interval. HR (95% CI) were calculated for an increment of 50 for each of CD3, CD8 and CD103.

Supplementary Table I: Differential gene expression profiles of TIL and PBMC

Sequence name	Accession N°	Sequence description	FC	Int TIL	Int PBMC
Adhesion					
<i>ITM2B</i>	NM_021999	integral membrane protein 2B	-2	5272	2634
<i>ITGB2</i>	NM_000211	integrin, beta 2	-3	19363	6067
<i>PLEK</i>	NM_002664	Pleckstrin	-4	1862	471
<i>ARRB2</i>	NM_004313	arrestin, beta 2	-4	8774	2186
<i>PXN</i>	NM_002859	Paxillin	-5	10915	2370
<i>APLP2</i>	NM_001642	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	-5	7460	1465
<i>VCL</i>	NM_014000	Vinculin	-6	1554	254
<i>PTGER2</i>	NM_000956	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	-6	1567	252
<i>ITGAM</i>	NM_000632	integrin, alpha M	-7	2077	314
<i>CD33</i>	NM_001772	CD33 molecule	-15	1204	80
<i>C5AR1</i>	NM_001736	complement component 5a receptor 1	-16	1428	89
<i>CD36</i>	NM_001001547	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-16	1102	68
<i>CSF3R</i>	NM_156039	colony stimulating factor 3 receptor	-22	5015	229
<i>VCAN</i>	NM_004385	Versican	-32	2784	87
<i>S100A9</i>	NM_002965	S100 calcium binding protein A9	-38	10434	272
<i>GP1BB</i>	NM_000407	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	-64	2389	37
<i>PPBP</i>	NM_002704	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	-284	1100	4
<i>PF4</i>	NM_002619	platelet factor 4	-412	1723	4
Activation					
<i>IL-15</i>	NM_172175	interleukin 15	-3	1046	304
<i>IL-17RA</i>	NM_014339	interleukin 17 receptor A	-4	2589	603
Inflammation					
<i>AIF1</i>	NM_004847	allograft inflammatory factor 1	-4	1128	316
<i>LYN</i>	NM_002350	v-src-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-4	6558	1798
<i>NLRP3</i>	NM_001243133	NLR family, pyrin domain containing 3	-8	1074	139
<i>FGR</i>	NM_001042747	feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog	-8	17139	2158
<i>LST1</i>	NM_007161	leukocyte specific transcript 1	-9	4485	507
<i>LILRB2</i>	NM_005874	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B member 2	-13	3371	254
<i>CFP</i>	NM_002621	complement factor properdin	-22	9319	426
<i>S100A8</i>	NM_002964	S100 calcium binding protein A8	-27	42026	1543
<i>S100A9</i>	NM_002965	S100 calcium binding protein A9	-38	10434	272
<i>FCN1</i>	NM_002003	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	-58	14482	251
<i>S100A12</i>	NM_005621	S100 calcium binding protein A12	-91	5163	57
<i>PPBP</i>	NM_002704	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	-284	1100	4
Apoptosis					
<i>Bnip2</i>	NM_004330	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2</i>	-3	4631	1662
<i>Tspo</i>	NM_000714	translocator protein (18kDa)	-3	36434	10732
<i>Cdkn2d</i>	NM_001800	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	-4	12890	2869
Metal ion binding					
<i>MAP3K3</i>	NM_203351	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	-2	5330	2299
<i>KLF13</i>	NM_015995	Kruppel-like factor 13	-3	11788	4340
<i>TKT</i>	NM_001064	Transketolase	-5	27727	5571
<i>KCNQ1</i>	NM_000218	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	-6	2024	358
<i>ZNF385A</i>	NM_015481	zinc finger protein 385A	-6	1622	286
<i>LMO2</i>	NM_005574	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	-12	3449	282
<i>ASGR2</i>	NM_080912	asialoglycoprotein receptor 2	-29	1028	35
Regulation DNA					
<i>KLF13</i>	NM_015995	Kruppel-like factor 13	-3	11788	4340
<i>SMARCD3</i>	NM_003078	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	-4	3089	775
<i>SPI1</i>	NM_001080547	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene	-9	3399	370
<i>MAFB</i>	NM_005461	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	-13	12102	920
Proliferation					
<i>MTPN</i>	NM_145808	Myotrophin	-2	2405	1139
<i>ARRB2</i>	NM_004313	arrestin, beta 2	-4	8774	2186
<i>PTGER2</i>	NM_000956	prostaglandin E receptor 2	-6	1567	252
<i>SLC7A7</i>	NM_001126106	solute carrier family 7	-8	2963	369
<i>ACRBP</i>	NM_032489	acrosin binding protein	-21	1077	51

Gene expression profiles of freshly isolated TIL were compared to those of PBMC from NSCLC patients (p-value < 10⁻¹⁰, Fold change > 2 and intensity expression > 1,000). The selected 70 genes, which were less strongly expressed in TIL than in PBMC, were classified according to their presumed biological functions by ingenuity software (www.ingenuity.com). Int TIL: intensity of transcripts obtained in TIL; Int PBMC: intensity of transcripts obtained in PBMC.

Supplementary Table II: Complete results of the univariate and the multivariate analyses for the disease free survival outcome

		Univariate			Multivariate			Multivariate			Multivariate			Multivariate			Multivariate		
		HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P-v
for an increase of 50 units	CD3 Total	0.96	(0.89-1.02)	0.2															
	CD3 Tumor	0.82	(0.65-1.03)	0.09															
	CD3 Stroma	0.96	(0.89-1.05)	0.4															
	CD8 Total	0.88	(0.78-0.99)	0.04	0.89	(0.78-1.02)	0.09												
	CD8 Tumor	0.72	(0.54-0.96)	0.02				0.70	(0.51-0.97)	0.03									
	CD8 Stroma	0.88	(0.74-1.04)	0.1															
	CD103 Total	0.84	(0.74-0.96)	0.01							0.85	(0.74-0.97)	0.02						
	CD103 Tumor	0.78	(0.63-0.96)	0.02										0.76	(0.61-0.96)	0.02			
	CD103 Stroma	0.76	(0.61-0.94)	0.01													0.80	(0.64-1.01)	0.06
Age	<65	1.00			1.00			1.00			1.00			1.00			1.00		
	≥65	2.48	(1.38-4.44)	0.002	1.88	(1.01-3.5)	0.05	1.74	(0.93-3.24)	0.08	1.59	(0.84-3)	0.15	1.57	(0.83-2.98)	0.16	1.81	(0.96-3.38)	0.07
Gender	female	1.00			1.00			1.00			1.00			1.00			1.00		
	male	1.34	(0.72-2.51)	0.4	1.59	(0.78-3.2)	0.20	1.55	(0.76-3.13)	0.23	1.63	(0.81-3.25)	0.17	1.71	(0.85-3.44)	0.13	1.56	(0.78-3.13)	0.21
Smoking status	Ever	1.00																	
	Never	1.09	(0.46-2.56)	0.8															
Stage	Stade Ia	1.00			1.00			1.00			1.00			1.00			1.00		
	Stade Ib	1.54	(0.81-2.92)	0.2	1.54	(0.75-3.16)	0.24	1.62	(0.79-3.32)	0.19	1.69	(0.82-3.47)	0.15	1.64	(0.8-3.35)	0.18	1.58	(0.77-3.24)	0.21
Histology	ADC	1.00			1.00			1.00			1.00			1.00			1.00		
	SCC	1.89	(1.04-3.45)	0.04	1.38	(0.69-2.76)	0.36	1.53	(0.76-3.08)	0.24	1.40	(0.7-2.78)	0.34	1.55	(0.77-3.1)	0.22	1.29	(0.65-2.59)	0.47
	Others	0.82	(0.28-2.42)	0.7	0.89	(0.31-2.58)	0.83	1.05	(0.36-3.08)	0.93	1.02	(0.35-2.95)	0.97	1.10	(0.38-3.24)	0.86	0.85	(0.3-2.42)	0.76

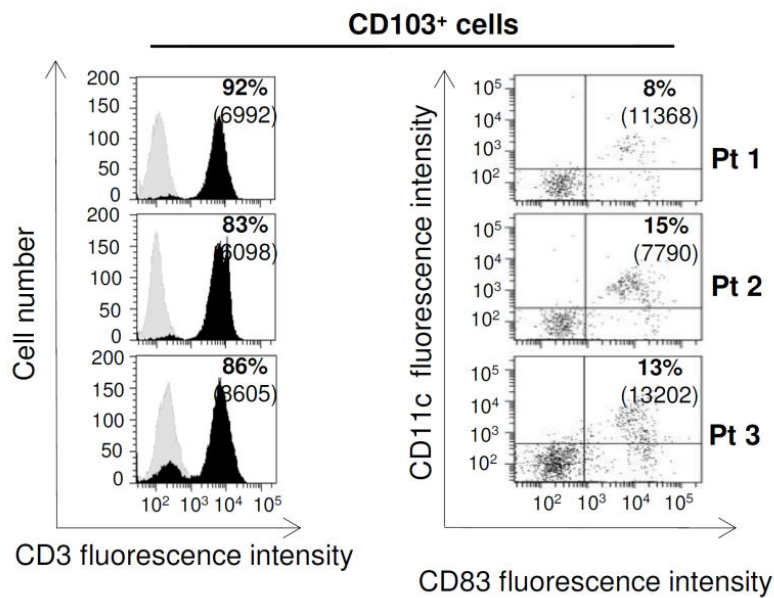
Stage Ia: pT1N0 and stage Ib: pT2N0. HR: Hazard Ratio, CI: confidence interval. The HR (95% CI) were calculated for an increment of 50 for each of CD3, CD8 and CD103. The p-value (p-v) was determined using Wilcoxon Rank or Kruskal Wallis test when appropriate.

Supplementary Table III: Complete results of the univariate and the multivariate analyses for the overall survival outcome

		Univariate			Multivariate			Multivariate			Multivariate		
		HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P-v	HR	95% CI	P-v
for an increase of 50 units	CD3 Total	0.97	(0.91-1.04)	0.40									
	CD3 Tumor	0.94	(0.76-1.15)	0.50									
	CD3 Stroma	0.97	(0.89-1.06)	0.50									
	CD8 Total	0.90	(0.8-1.02)	0.10									
	CD8 Tumor	0.83	(0.63-1.09)	0.20									
	CD8 Stroma	0.88	(0.74-1.05)	0.20									
	CD103 Total	0.88	(0.77-0.99)	0.04	0.89	(0.78-1.02)	0.09						
	CD103 Tumor	0.84	(0.69-1.03)	0.09				0.84	(0.66-1.05)	0.13			
	CD103 Stroma	0.78	(0.62-0.98)	0.03							0.84	(0.67-1.06)	0.14
Age	<65	1.00			1.00			1.00			1.00		
	≥65	2.99	(1.62-5.51)	0.001	2.17	(1.11-4.21)	0.02	2.15	(1.1-4.22)	0.03	2.36	(1.23-4.53)	0.01
Gender	Female	1.00			1.00			1			1.00		
	Male	1.70	(0.86-3.37)	0.10	1.85	(0.85-4.01)	0.12	1.89	(0.87-4.12)	0.11	1.79	(0.83-3.89)	0.14
Smoking status	Ever	1.00											
	Never	0.52	(0.16-1.69)	0.30									
Stage	Stade Ia	1.00			1.00			1			1.00		
	Stade Ib	1.67	(0.84-3.32)	0.10	1.57	(0.72-3.44)	0.26	1.54	(0.7-3.36)	0.28	1.50	(0.69-3.26)	0.31
Histology	ADC	1.00			1.00			1			1.00		
	SCC	2.58	(1.35-4.92)	0.004	1.62	(0.76-3.45)	0.21	1.75	(0.82-3.75)	0.15	1.52	(0.71-3.25)	0.28
	Others	1.15	(0.38-3.47)	0.80	1.26	(0.42-3.77)	0.68	1.31	(0.43-4)	0.64	1.10	(0.37-3.23)	0.87

Stage Ia: pT1N0 and stage Ib: pT2N0. HR: Hazard Ratio, CI: confidence interval. The HR (95% CI) were calculated for an increment of 50 for each of CD3, CD8 and CD103. The p-value (p-v) was determined using Wilcoxon Rank or Kruskal Wallis test when appropriate.

A



B

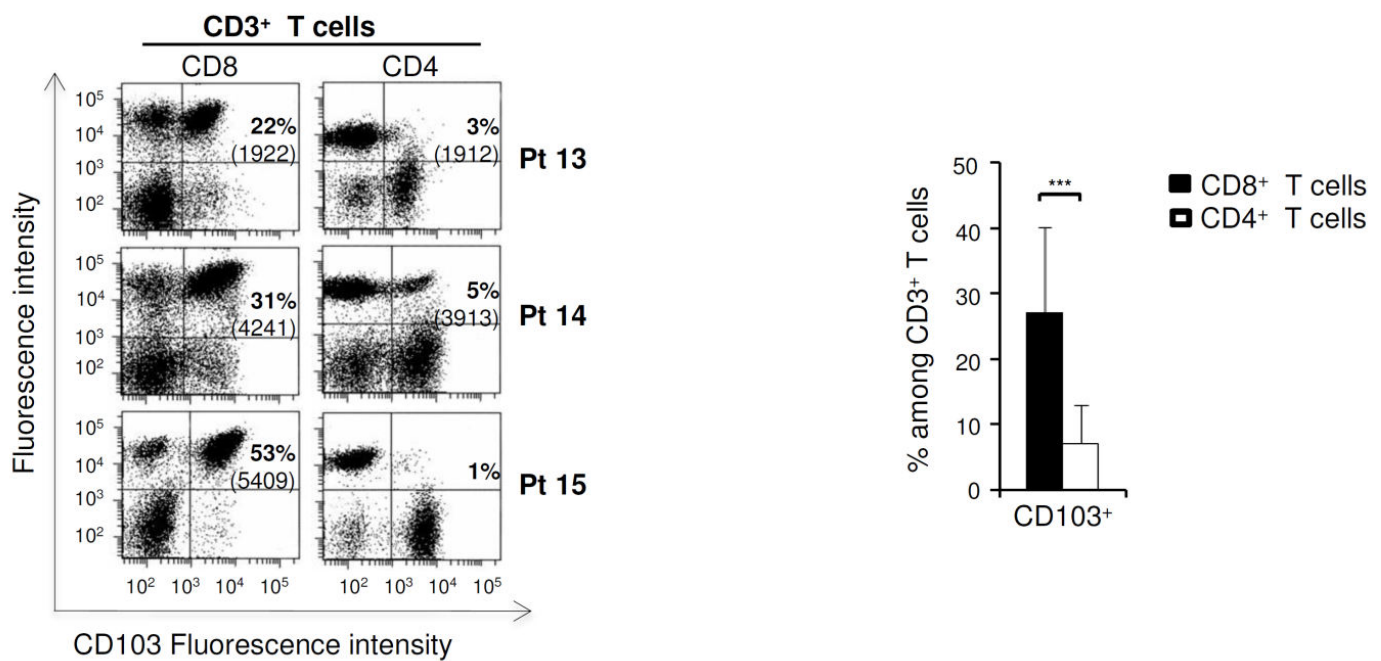
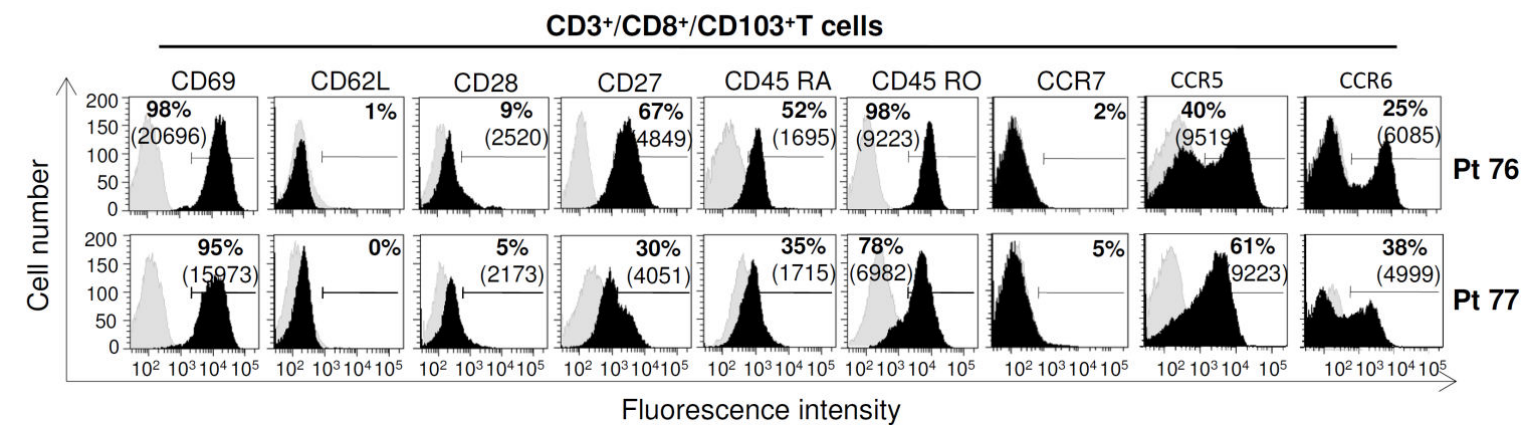
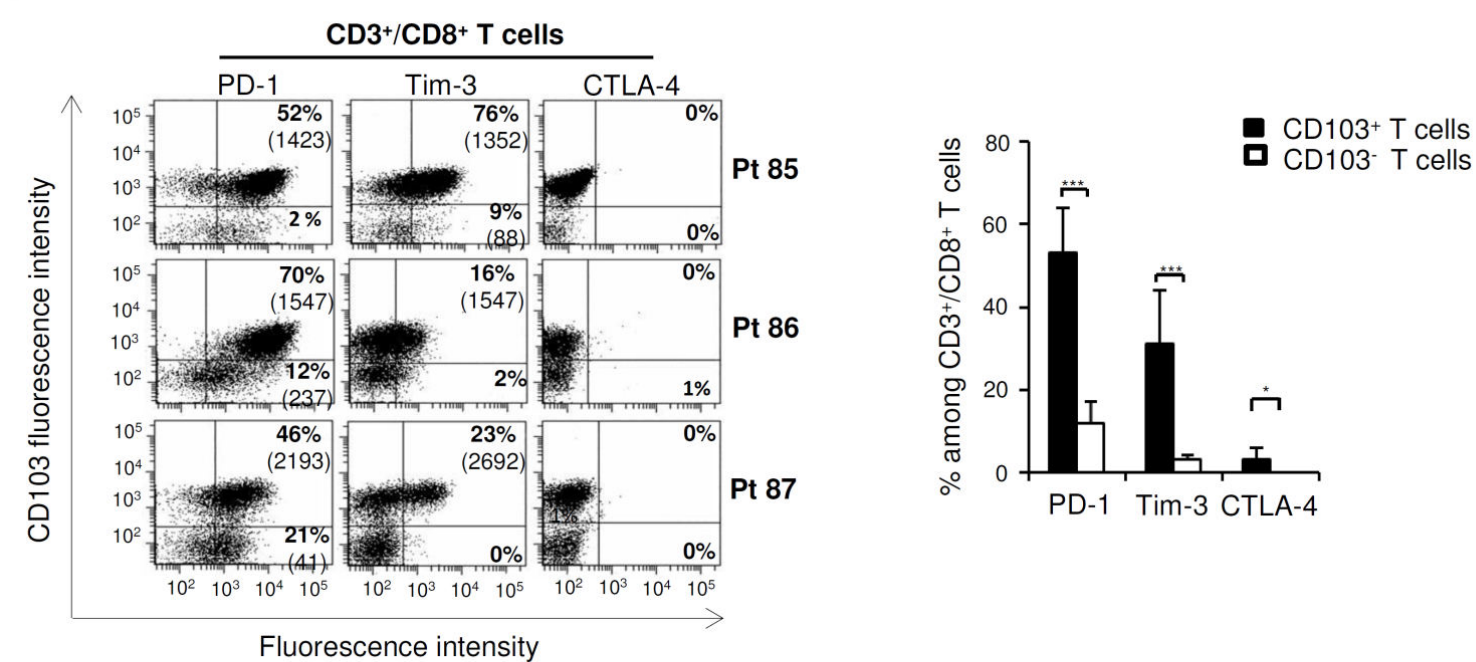


Figure 1

A



B



C

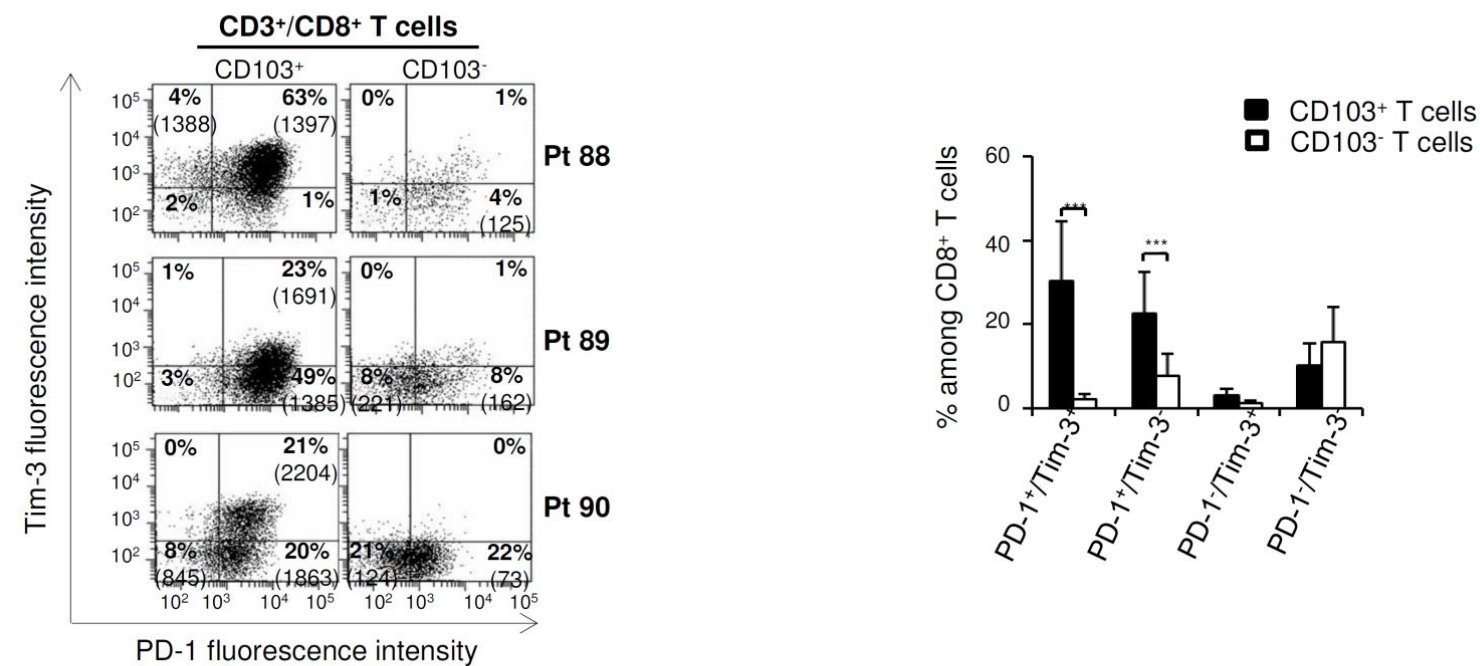
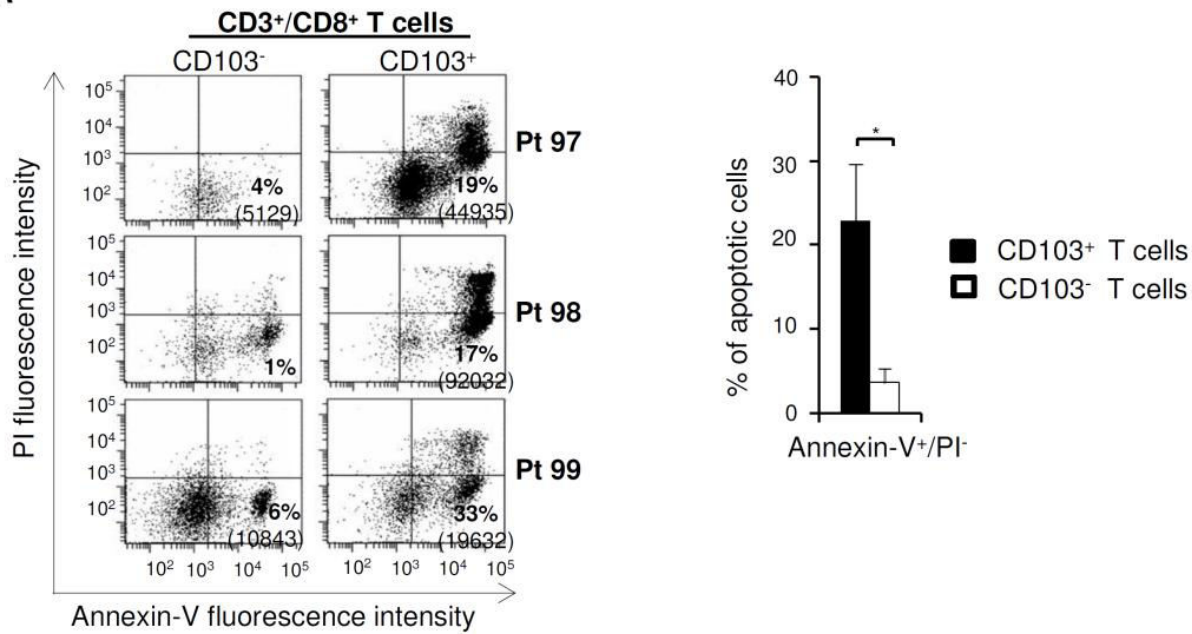
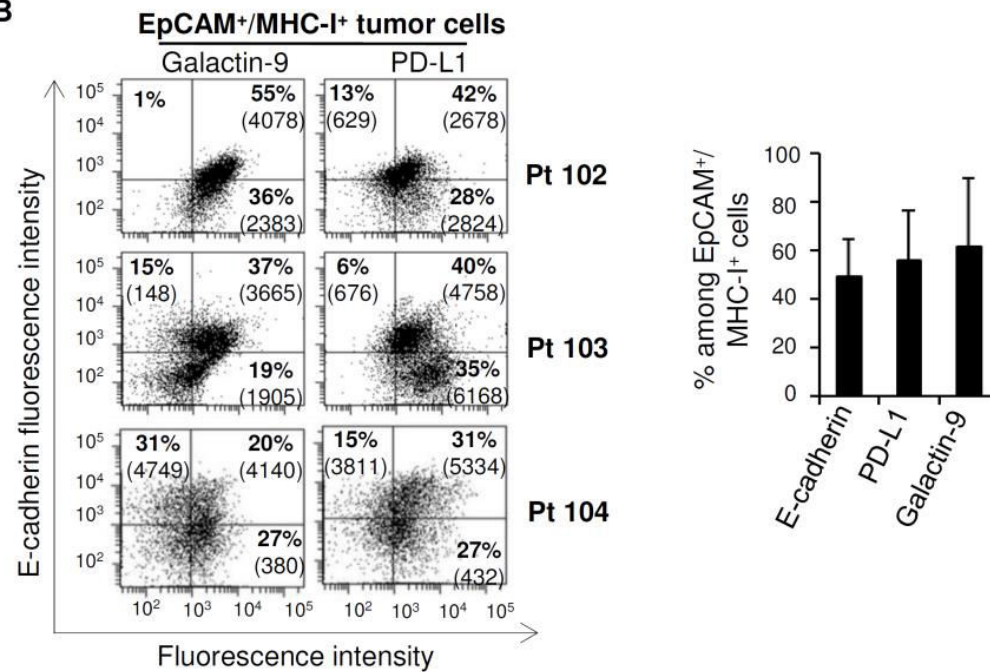


Figure 2

A



B



C

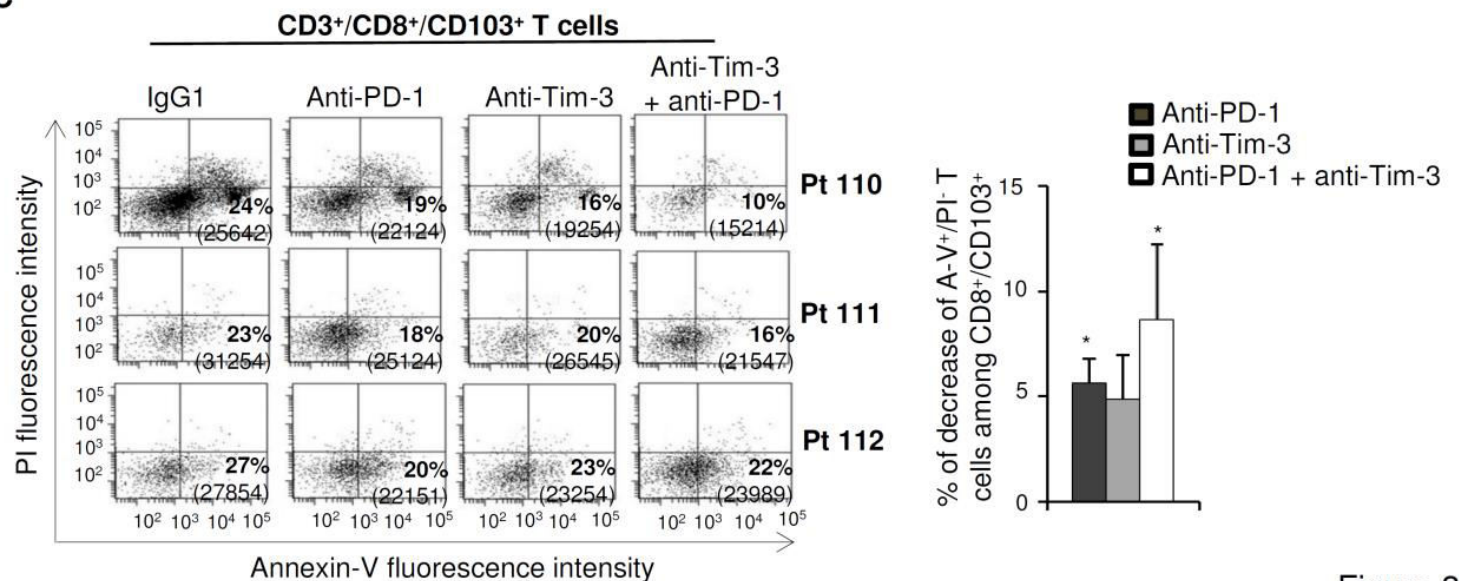
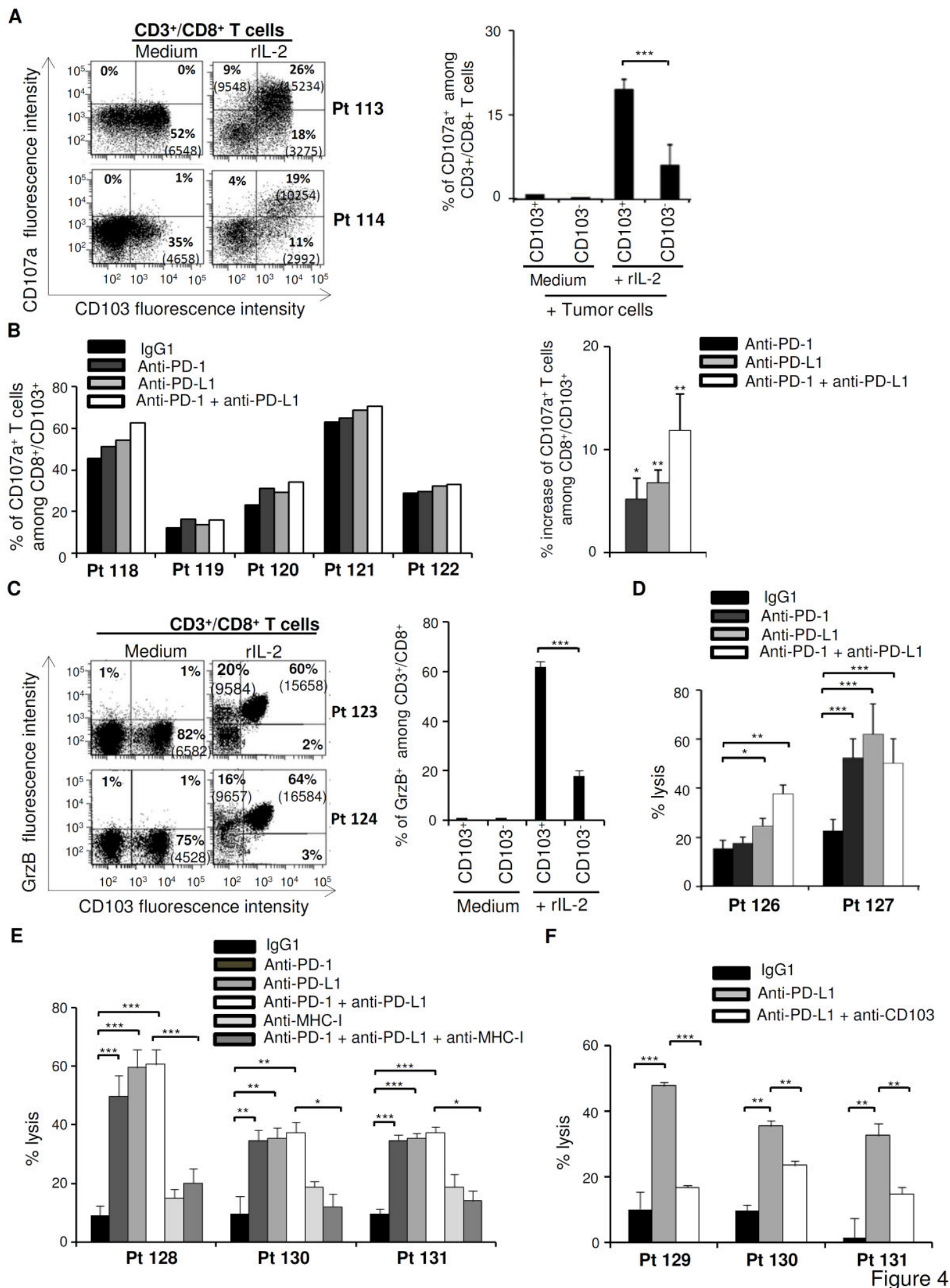


Figure 3



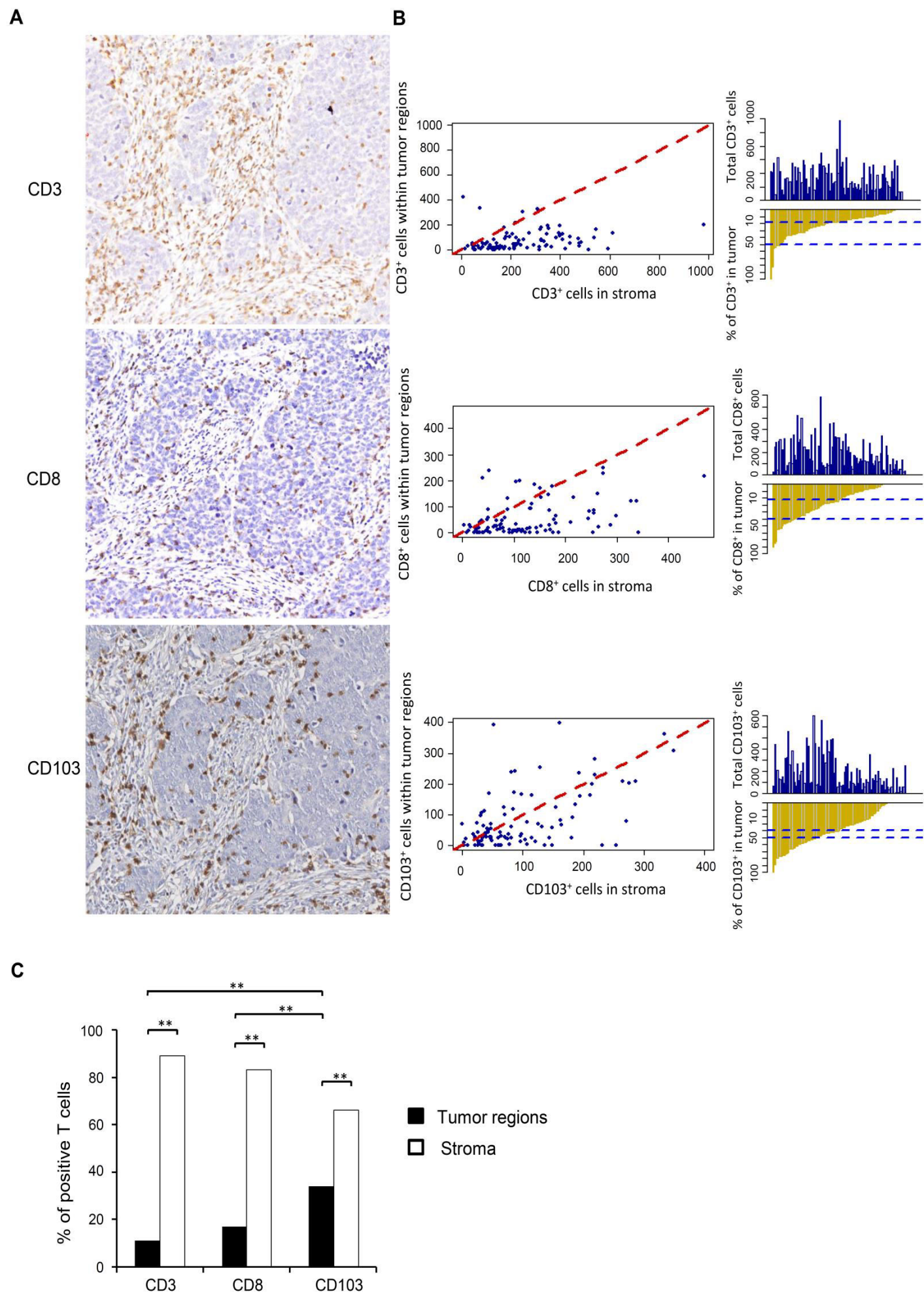
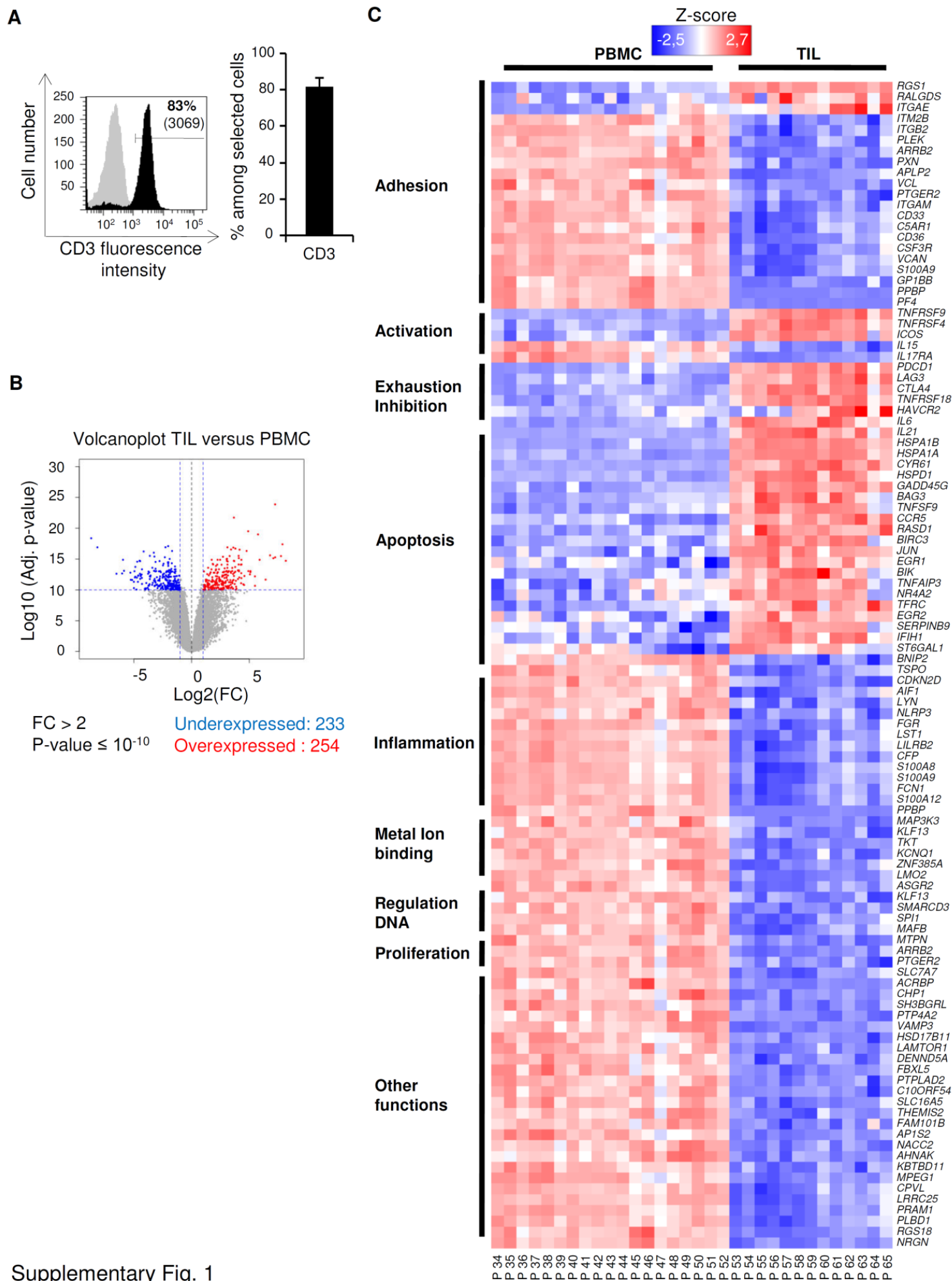
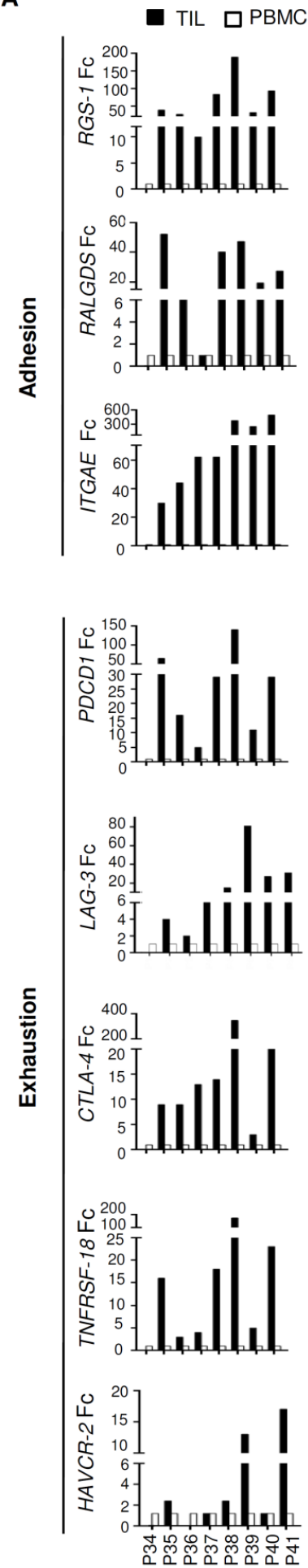


Figure 5



Supplementary Fig. 1

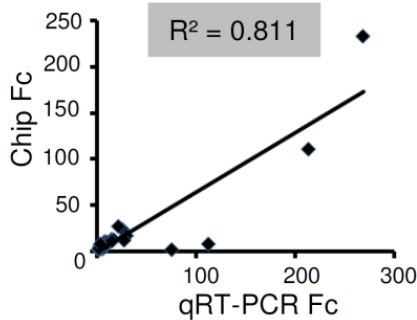
A



Activation

Apoptosis

B

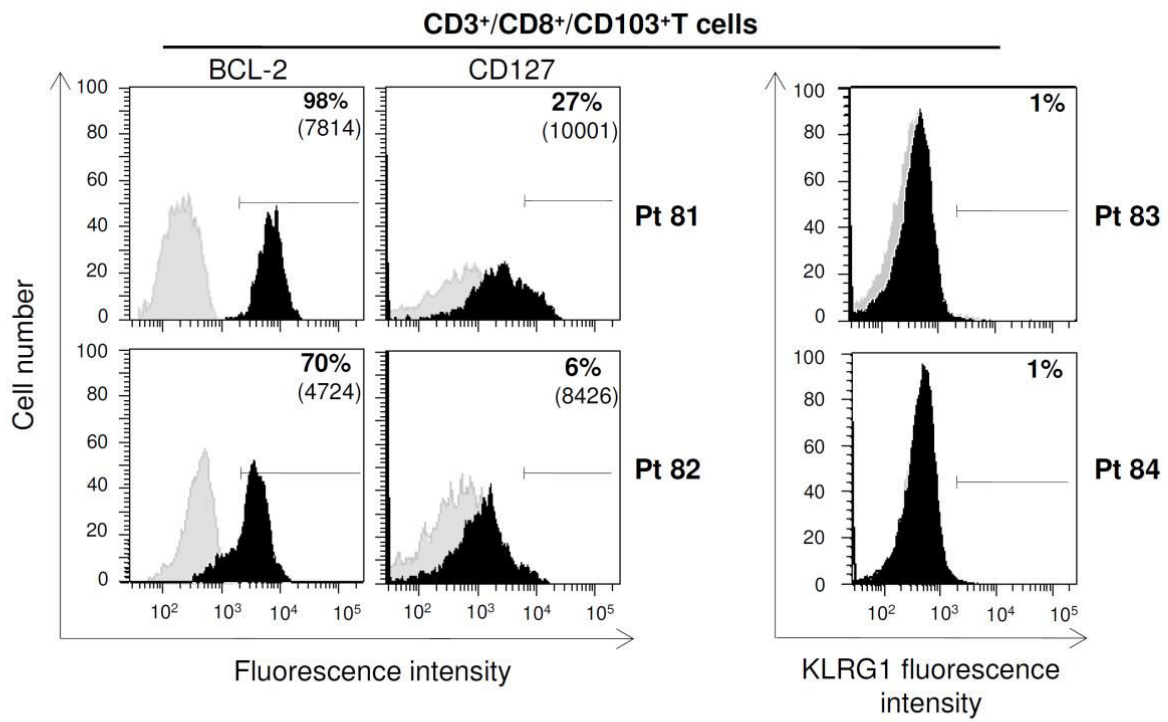


C

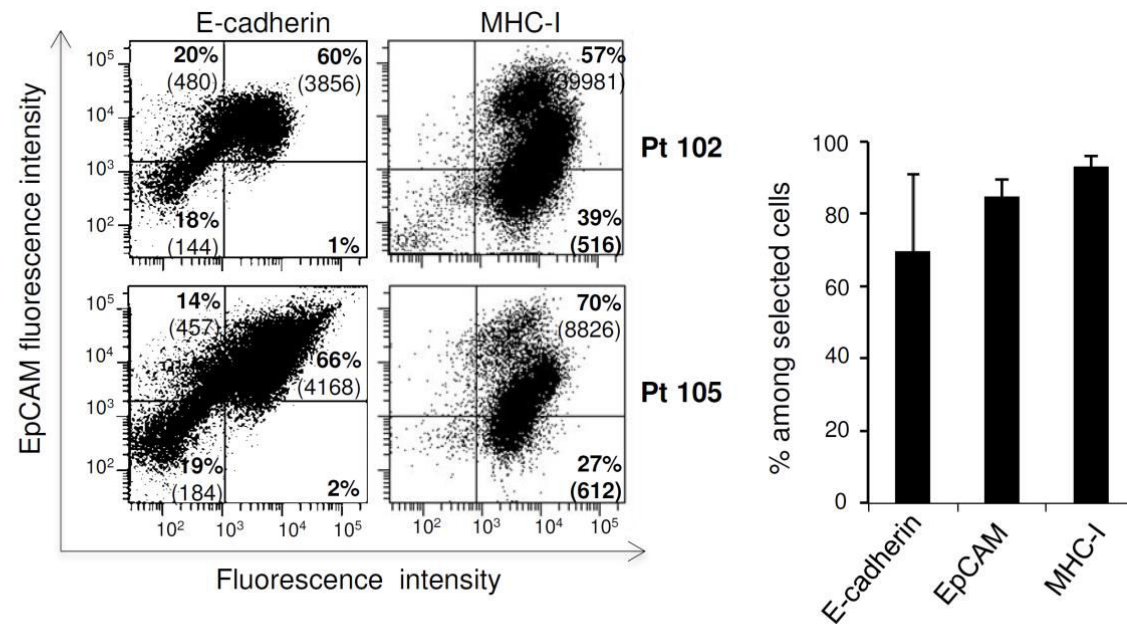
Sequence name	Fc
S1P1	-9
EGR1	2
IFIH1	2
ST6GAL1	2
RALGDS	3
TNFRSF-4	3
TFRC	3
SERPINB9	3
BIRC3	4
TNFAIP3	4
HAVCR2	5
BIK	5
EGR2	5
ICOS	7
BAG-3	8
NR4A2	8
TNFRSF-18	9
HSPD1	9
TNFSF9	9
JUN	9
IL-6	9
RASD1	11
CTLA-4	14
GADD45G	20
PDCD1	21
CCR5	21
LAG-3	26
RGS1	38
TNFRSF-9	41
IL-21	41
HSPA1B	187
HSPA1A	334
CYR61	386
ITGAE	473

Supplementary Fig. 2

A



B



Supplementary Fig. 3

Projet 2 :

2. Rôle de l'intégrine CD103 dans le recrutement et la rétention des lymphocytes T CD8⁺ au site tumoral dans un modèle *in vivo* de souris.

Résumé :

Afin d'étudier le rôle de l'intégrine CD103 dans la potentialisation de la réponse immunitaire antitumorale j'ai développé un modèle *in vivo* de souris. Pour ce faire, j'ai transfecté la tumeur pulmonaire murine LL2 avec le ligand de CD103, E-cadhérine (E), avant de la transplanter dans les souris C57BL/6 (WT, CD103-KO). Dans le but d'optimiser le recrutement et la rétention des LT dans la tumeur, j'ai transfecté la lignée LL2 avec la chimiokine CCL5. En effet, les travaux antérieurs de mon équipe ont montré que CD103 permet la rétention des TIL dans la tumeur par un mécanisme dépendant de CCR5 (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). Dans un premiers temps, j'ai comparé la croissance tumorale de tumeurs non transfectées ou transfectées avec E-cadherine ou CCL5 seule, ou la combinaison des deux. J'ai ainsi montré que la transfection avec combinaison de l'E-cadherine avec la chimiokine CCL5 entraîne un retard de la croissance tumorale qui est corrélé avec un prolongement de la survie des souris et une meilleure infiltration des TIL dans la tumeur. L'analyse de l'infiltrat lymphocytaire m'a permis d'observer une expression de CD103 essentiellement sur les LT CD4⁺ et peu sur les LT CD8⁺. La transfection de LL2 avec l'E-cadherine et de la chimiokine CCL5 optimise le recrutement des LT CD8⁺/CD103⁺. Dans un second temps, j'ai comparé la croissance tumorale dans les souris CD103-WT à celle dans les souris déficientes pour CD103. De manière inattendue, la progression tumorale chez les souris CD103-KO est plus lente que dans les souris CD103-WT. Ceci pourrait être corrélé à une forte expression de CD103 sur les TIL CD4⁺/Foxp3⁺.

Afin de mieux comprendre le rôle de CD103 dans la régulation de la réponse immunitaire antitumorale spécifique, j'ai comparé la composition des infiltrats des souris CD103-WT et CD103-KO, ainsi que les profils transcriptionnels des TIL.

Résultats :

1. Développement d'un modèle *in vivo* de souris CBNPC

Pour étudier le rôle de CD103 dans la réponse antitumorale *in vivo*, j'ai transfecté les cellules murines de cancer du poumon LL2 avec un plasmide qui code la protéine murine E-cadhérine. J'ai également transfecté la lignée LL2 avec la chimiokine CCL5 (RANTES) seule ou en combinaison avec la E-cadhérine, ceci dans le but afin d'optimiser le recrutement des LT au sein du microenvironnement tumoral grâce au rôle chimioattractant de CCL5. De plus, mon équipe a démontré que CCL5 joue un rôle important non seulement dans la recrutement des LT dans la tumeur, mais aussi que son récepteur CCR5 est impliqué dans la rétention des LT dans les tissus tumoraux par un mécanisme dépendant de l'interaction CD103/E-cadherine et de la polarisation de CCR5 dans la SI (Franciszkiewicz, Le Floch et al. 2009).

Les résultats présentés dans la figure 15 montrent que la lignée LL2 est déficiente pour l'expression de la E-cadhérine, et que sa transfection avec un plasmide codant la E-cadhérine murine induit une expression membranaire stable de la protéine (LL2E) (**Fig. 15A**). De plus, l'infection de LL2 et LL2E avec un lentivirus codant CCL5 murin induit un niveau d'expression élevée de la chimiokine dans les lignées cellulaires LL2-RANTES (LL2R) et LL2-E-cadherine/RANTES (LL2ER) comme le montrent les analyses d'immunofluorescence intracytoplasmiques (**Fig. 15A**). Comme la transfection de LL2 avec la E-cadhérine et/ou CCL5 pourrait induire un changement dans la croissance cellulaire, j'ai analysé la prolifération de la lignée tumorale parentale et les différents clones transfectés en utilisant le test d'incorporation de H3-thymidine. Les analyses de prolifération montrent que la lignée et les 3 clones LL2 ont des capacités similaires de prolifération ($R^2 = 0,98$ à $0,99$) (**Fig. 15B**). Cela signifie que la transfection de cellules LL2 avec CCL5 et/ou de la E-cadhérine et la génération de clones spécifiques n'ont aucun effet sur la capacité de prolifération. Ceci est d'un intérêt majeur pour le suivi de la croissance tumorale et de la réponse immunitaire antitumorale *in vivo*.

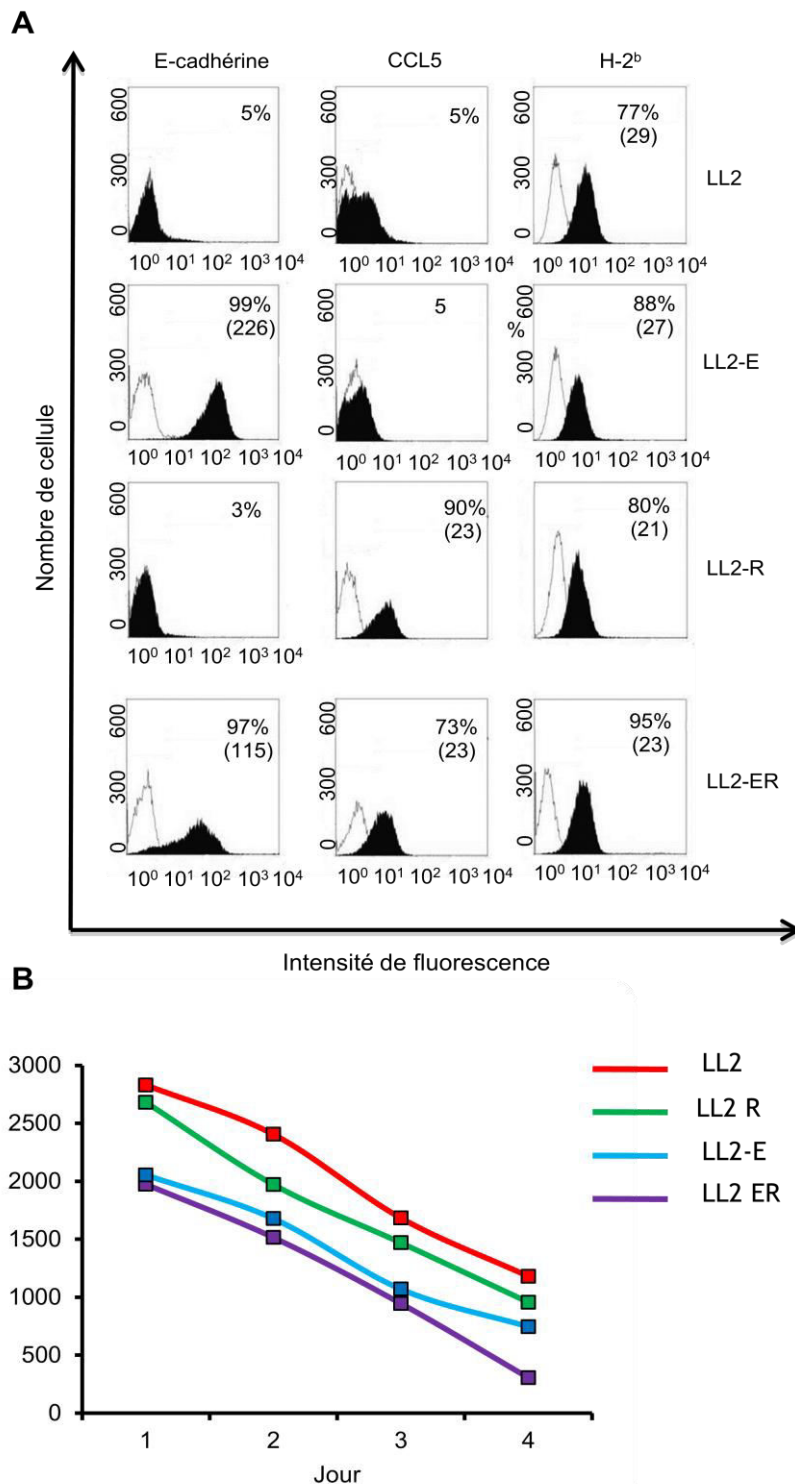


Figure 15. Modèle expérimental murin. A. Transfection stable de LL2 avec la E-cadhérine et en combinaison ou non avec ou CCL5. Les lignées cellulaires LL2 transfectées avec la E-cadhérine et/ou RANTES, ont été analysées par cytométrie en flux pour l'expression du CMH-I (H-2^b), Rantes (CCL5) et E-cadhérine en utilisant les Ac indiqués (zone noire). Un contrôle isotypique a été inclus (zones vides). Les pourcentages de cellules positives sont indiqués. Les moyennes d'intensité de la fluorescence (MFI) sont entre parenthèses. **B.** Taux de prolifération des cellules LL2 transfectées. Les clones et la lignée parentale LL2 ont été analysés pour leur potentiel de prolifération en utilisant le test d'incorporation de H3-thymidine durant 4 jours.

2. Effet de la E-cadherine et/ou de CCL5 sur la réponse immunitaire

L'interaction de CD103 avec la E-cadhérine joue un rôle majeur dans la réponse CTL antitumorale. Pour examiner son rôle dans cette fonction antitumorale *in vivo*, j'ai donc étudié la progression tumorale de la lignée LL2 transfecté avec la E-cadherine en combinaison ou non de CCL5 greffées dans des souris syngéniques. A cet effet, LL2, LL2R, LL2E et LL2 ER ont été injectées dans des souris C57BL/6, puis la croissance tumorale et la survie des animaux ont été surveillées. De plus, le comportement et le poids des souris a également été surveillé. Mes résultats indiquent que la transfection de LL2 avec la E-cadhérine seule entraine une augmentation accrue de progression tumorale dans la souris C57BL/6 CD103-WT. Ceci est probablement dû à une meilleure cohésion cellulaire grâce à des liaisons homotypiques E-cadhérine-E-cadhérine (**Fig. 16A**).

De manière intéressante, la cotransfection de LL2 avec CCL5 entraine une meilleure infiltration des tumeurs avec des TIL et une diminution de la croissance tumorale. Ces résultats montrent que CCL5 joue bien un rôle de molécule chimio-attractante dans ce modèle tumoral murin LL2 et que E-cadherine intervient probablement dans leur rétention au site tumoral. La stabilité d'expression des transgènes *in vivo* dans les lignées LL2E, LL2R et LL2ER a été vérifiée par la récupération des tumeurs au seizième jour après l'inoculation des cellules dans des souris C57BL/6 et une analyse par FACS.

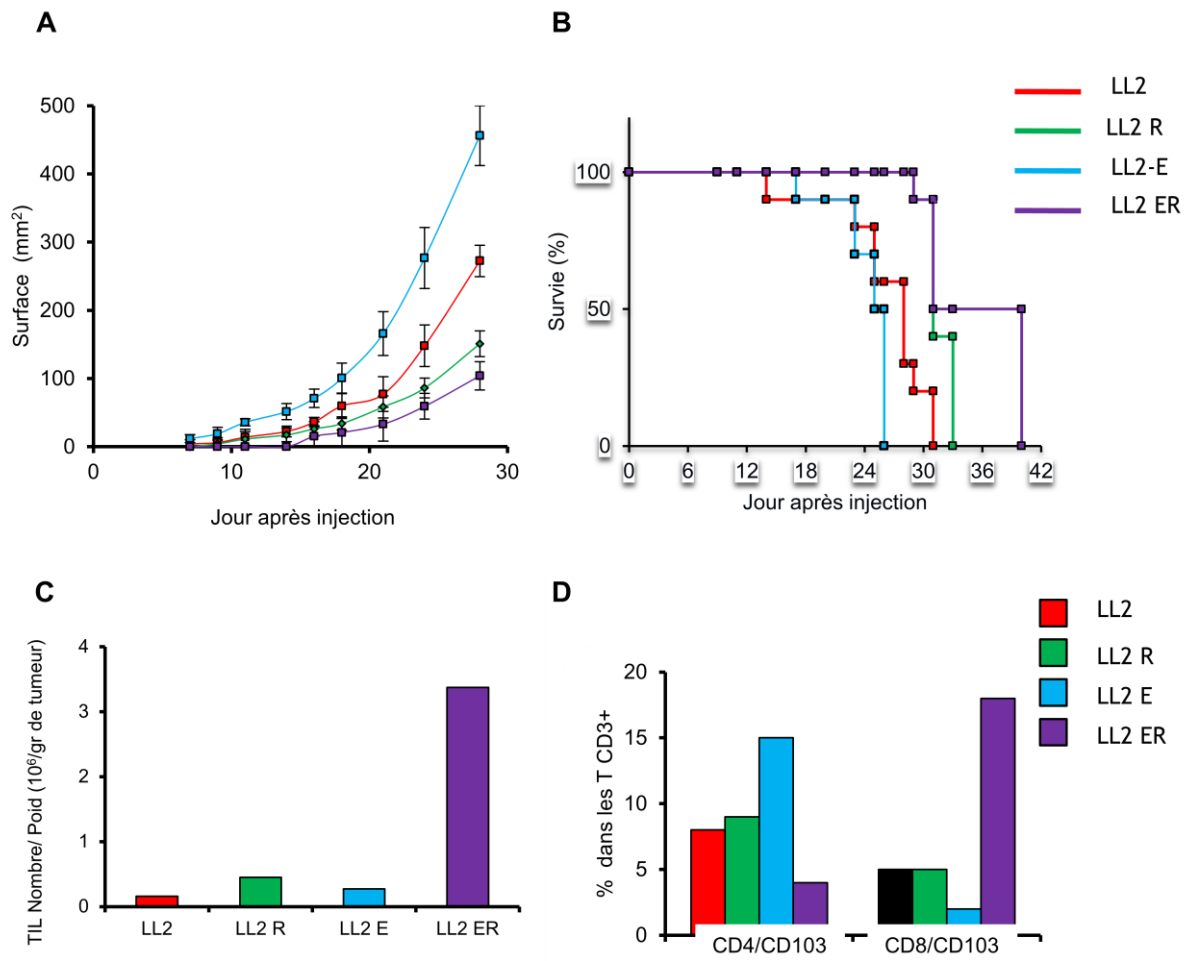


Figure 16. Rôle CD103 et de CCL5 dans la réponse immunitaire antitumorale. **A.** Rôle de la E-cadhérine et CCL5 dans la progression tumorale *in vivo*. Représentation graphique de la progression tumorale des lignées LL2, LL2R, LL2E et LL2 ER injectées dans des souris C57BL/6. Les mesures des tumeurs ont été effectuées à deux ou trois jours d'intervalle. Les cellules parentales LL2, LL2 E-cadhérine (LL2E), LL2-RANTES (LL2R) et LL2 E-cadhérine CCL5 (LL2ER) sont représentées. Echelle : mm. **B.** Influence de la E-cadhérine et CCL5 sur la survie des animaux. Représentation graphique de la cinétique de survie des différents groupes de souris en fonction du temps après injection des différents clones de LL2. Le nombre de souris mortes a été compté tous les jours. Les souris avec une tumeur supérieure à 4 cm² du volume ont été sacrifiées et considérées comme mortes. **C.** Rôle de la E-cadhérine et CCL5 dans le *homing* et la rétention des TIL. Représentation graphique de l'infiltration des différents groupes des tumeurs LL2 par les TIL. Le nombre total de cellules T CD3⁺ par gramme de tumeur sont présentés (les tumeurs ont été pesées, dissociées et le nombre total de TIL a été déterminé ainsi que le nombre de TIL par gramme de tumeur (TIL millions/gr de tumeur) (n=3). **D.** Distribution de l'expression de CD103 dans les sous-populations de lymphocytes T CD3⁺. Représentation graphique de l'expression de CD103 dans les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ dans les différents groupes de tumeurs LL2 (n=3).

J'ai ensuite analysé l'effet de la co-transfection des tumeurs LL2 avec la E-cadhérine et CCL5 sur la survie de la souris. Les souris greffées avec les lignées LL2-ER survivent plus longtemps que les souris inoculées avec des cellules parentales LL2 ou LL2-E seule. La transfection de cellules tumorales LL2 transfectée avec CCL5 seule a moins d'effet sur la survie des souris que lorsqu'elle est associée à la E-cadhérine (**Fig. 16B**). Ces données suggèrent que la transfection de LL2 avec RANTES induit l'inhibition de la progression de la tumeur en déclenchant le recrutement de cellules immunitaires au site tumoral. Ils suggèrent également que la co-transfection de LL2 avec CCL5 et E-cadhérine engendre la rétention des LT au sein de la tumeur suite à l'induction de CD103 sur les LT spécifiques de la tumeur et son interaction hétérotypique avec la E-cadhérine.

3. Rôle de CD103 dans la rétention des TIL dans la tumeur

La rétention des LT spécifiques de la tumeur pourrait déclencher la lyse des cellules cibles et donc la survie des souris. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai suivi l'infiltration de cellules mononuclées dans les lignées LL2, LL2-R, LL2-E et LL2-ER à différents moments de la greffe des tumeurs dans des souris C57BL/6 sauvage. Les études cinétiques ont montré que CCL5 seule a peu d'effet sur l'infiltration de la tumeur par les TIL (**Fig. 16C**). En revanche, la co-transfection de cellules LL2 avec la E-cadhérine et CCL5 induit une augmentation nette du nombre total de TIL dans les tumeurs LL2-ER. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que la sécrétion intratumorale de CCL5 par les tumeurs épithéliales E-cadherine⁺ induit un recrutement et la rétention des LT spécifiques de la tumeur et entraîne donc un retard dans la progression tumorale.

J'ai ensuite analysé la distribution de CD103 dans les différentes sous-populations de LT. Les résultats représentés dans la figure 16D, montrent que CD103 est majoritairement exprimée par les LT CD4⁺ et ce dans les tumeurs LL2, LL2E et LL2R. Par contre dans la tumeur LL2 ER, la molécule CD103 est exprimée majoritairement sur les LT CD8⁺ (**Fig. 16D**).

4. Croissance tumorales et infiltration antitumorale des tumeurs des souris CD103-WT vs CD103-KO

Afin de mieux comprendre l'implication de l'intégrine CD103 dans la réponse immunitaire, j'ai comparé la progression tumorale des différents clones LL2 injectés dans les souris CD103-WT et des souris CD103-KO. De manière surprenante, la progression tumorale dans les souris CD103-KO est plus ralentie que dans les souris CD103-WT, et cela s'observe surtout dans les souris greffées avec les lignées tumorales LL2 et la LL2E. Une faible différence de croissance tumorale est observée avec les lignées tumorales LL2R et LL2ER (**Fig. 17A-B**).

Afin de comprendre les différences de progression tumorale des différents clones dans les souris CD103-WT et CD103-KO, j'ai analysé l'infiltration lymphocytaire dans chacune des tumeurs. Les résultats montrent que le nombre de TIL est similaire entre dans les deux lignées de souris sauf pour les LL2ER où je n'observe pas l'augmentation d'infiltrat dans la souris CD103-KO comme dans les souris CD103-WT (**Fig. 17C**).

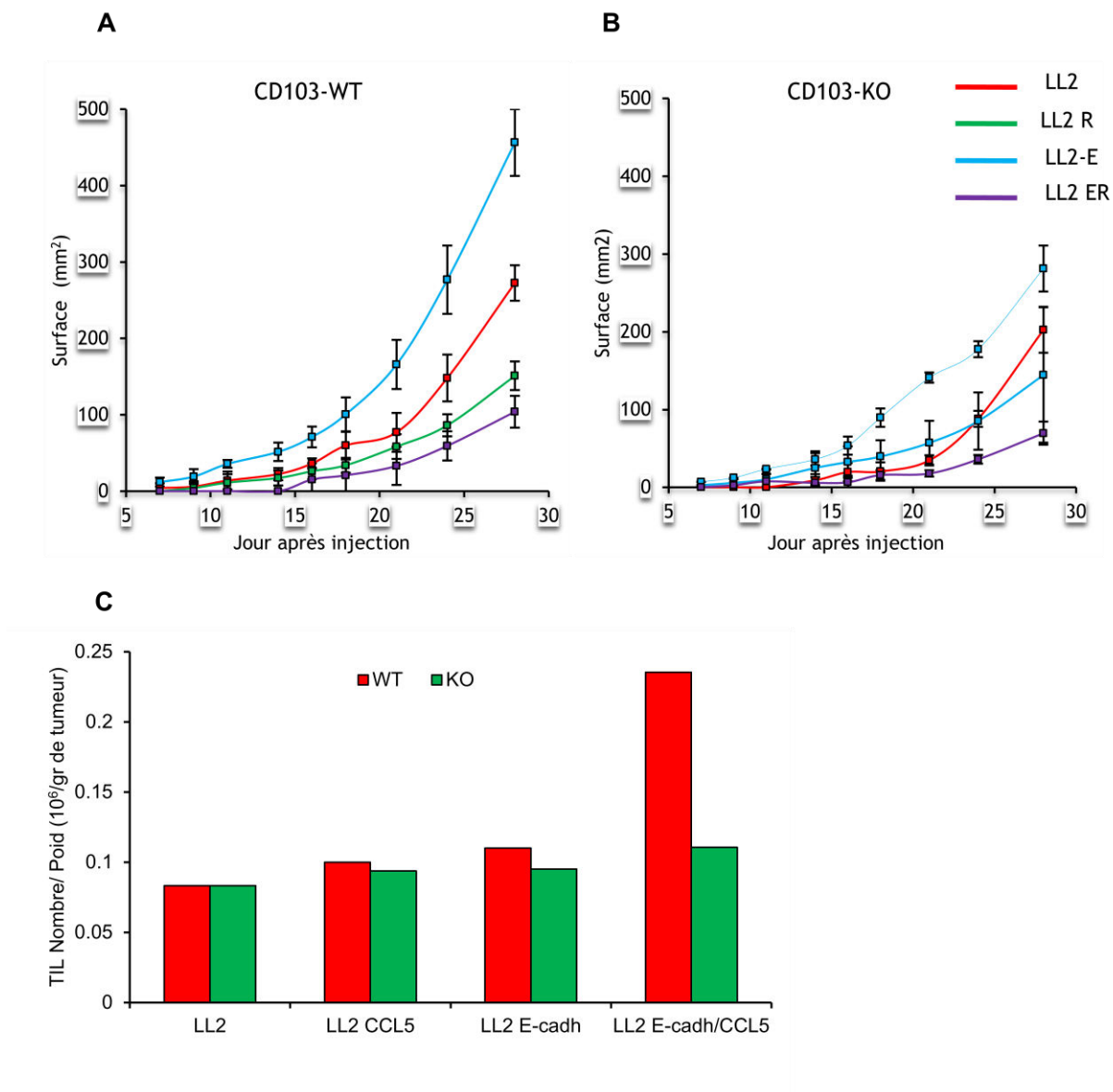


Figure 17. Comparaison de la croissance tumorales et de l'infiltration lymphocytaire entre les souris CD103-WT vs CD103-KO. A-B. Représentation graphique de la progression tumorale des lignées LL2, LL2R, LL2E injectées dans des souris CD103-WT vs CD103-KO. Les mesures des tumeurs ont été effectuées à deux ou trois jours d'intervalle. Cellules parentales LL2, LL2 E-cadhérine (LL2E), LL2-RANTES (LL2R) et LL2 E-cadhérine + CCL5 (LL2ER). Echelle : mm. **C.** Représentation graphique de l'infiltration des différents groupes de tumeurs LL2 par les TIL dans les souris CD103-WT vs CD103-KO. Le nombre total de cellules T CD3⁺ par gramme de tumeur est présenté (les tumeurs ont été pesées, dissociées et le nombre total de TIL a été déterminé et le nombre de TIL par gramme de tumeur a été calculé (TIL millions/gr de tumeur)).

5. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des TIL issus de souris CD103-WT vs CD103-KO

Afin de déterminer le rôle exact de l'intégrine CD103 dans la régulation de la réponse immunitaire antitumorale, j'ai comparé aussi les profils transcriptionnels des TIL issus, de tumeurs transfectées ou non avec la E-cadhérine et/ou CCL5, transplantées dans les souris CD103-WT ou CD103-KO. Pour cela, j'ai récupéré les TIL des souris C57BL/6 WT (fourni par Harlan) et KO pour CD103 (élevage à l'IGR) à J-16 après injection des cellules tumorales en sous-cutanée. J'ai ensuite purifié les TIL grâce au Kit Dynabeads® FlowComp™ Flexi (Invitrogen) en utilisant l'anticorps CD90.2 qui nous permet d'avoir environ 85% cellules CD3⁺ (Tabbekh, Franciszkiewicz et al. 2011). J'ai ensuite extrait les ARN ($\geq 2\mu\text{g}$) et comparé les profils d'expression génique des TIL CD103-WT et CD103-KO. Les résultats préliminaires d'analyse des résultats des puces des TIL WT et KO issus de tumeurs LL2, ont montré que les TIL-WT expriment plus les récepteurs d'inhibition PD-1, Tim-3, CTLA-4 et LAG-3 que les souris déficientes pour CD103 (**Fig. 18A**). Des analyses de cytométrie de flux ont montré que PD-1 est surexprimé dans les souris CD103-WT par rapport aux souris CD103-KO. Par opposition, l'expression de Tim-3 est similaire (**Fig. 18B**). Ainsi, on peut penser que les TIL qui sont dans un état d'épuisement à cause de l'expression à leur surface de ces récepteurs inhibiteurs, ne sont pas capables d'exercer un effet antitumoral.

Ensuite, j'ai comparé le phénotype des TIL issus de souris CD103 WT au souris CD103-KO. Les résultats montrent des profils semblables entre les deux lignées de souris. En outre, les résultats montrent que la plupart des TIL présentent un phénotype CD27^{high}/CD62L^{low}, ce qui suggère qu'ils correspondent à des cellules effectrices/T mémoires (**Fig. 18C**). En revanche, j'observe une expression légèrement plus élevée des marqueurs d'activation CD69, CD25 et CD28 dans les TIL *CD103-KO* par rapport aux TIL CD103-WT. De plus, j'observe une légère baisse du marqueur des cellules naïves CD45RA dans les souris CD103-KO. Ces résultats montrent aussi une augmentation des marqueurs d'activation (CD69, CD28, CD25) en présence de la chimiokine CCL5.

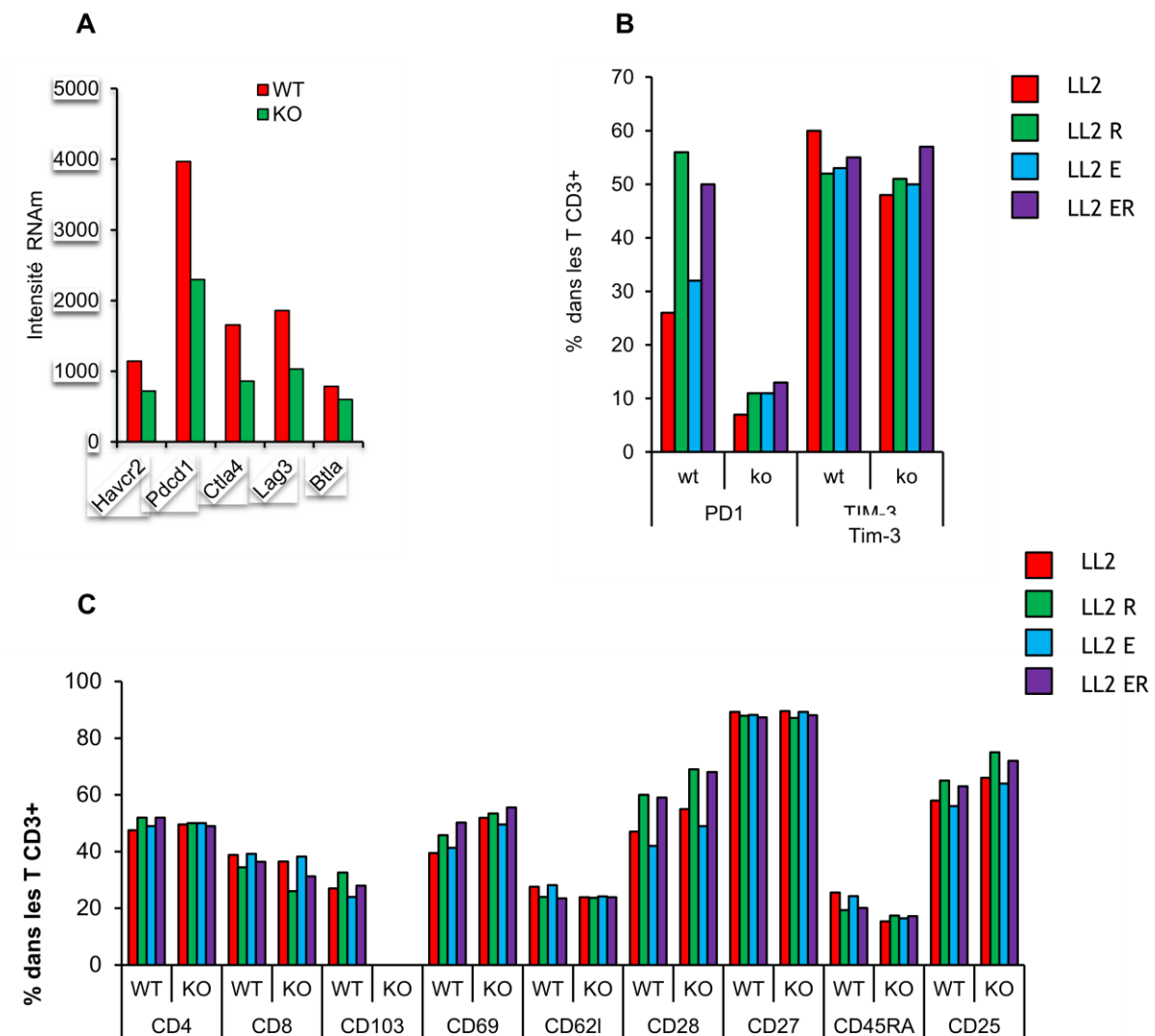


Figure 18. Caractérisation phénotypique des TIL issus des souris CD103-WT vs CD103-KO.

A. Représentation graphique d'expression des récepteurs inhibiteurs en intensité. **B.** Représentation graphique du pourcentage d'expression des différents récepteurs membranaires PD-1 et de Tim-3 par les TIL CD3⁺ dans les différentes lignées de LL2. **C.** Comparaison de phénotype des TIL dans les souris CD103-WT vs CD103-KO. Représentation graphique des pourcentages d'expression des récepteurs membranaires CD69, CD62L, CD28, CD27, CD45RA et CD25 par les TIL CD3⁺ des différentes lignées LL2.

DISCUSSION

Le cancer de poumon est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer du poumon touche 900 000 hommes et 330 000 femmes par an et est responsable de 1,2 million de décès. En France, 35 000 nouveaux cas de cancer du poumon sont diagnostiqués chaque année et bien que le nombre d'hommes qui meurent du cancer du poumon soit en légère baisse, son incidence est en constante augmentation chez les femmes et ceci est en corrélation avec l'augmentation du tabagisme dans cette population. La chirurgie est habituellement effectuée dans les cas de CBNPC, qui représentent le type de cancer du poumon le plus courant (80% de tous les cancers du poumon) et comprend les ADC, résultant généralement dans les zones extérieures ou périphériques du poumon, les CCN, situés le plus souvent dans la zone centrale de la poitrine et les bronches, et les LCC, parfois appelés carcinomes indifférenciés, qui sont les moins communs de CBNPC. Une intervention chirurgicale est rarement possible dans les CBPC, qui comprennent environ 20% de la plupart des cancers du poumon qui sont agressifs et à croissance rapide. Les CBNPC sont moins susceptibles d'être localisés dans une zone qui peut être enlevée. Ils métastasent rapidement au niveau de plusieurs sites et sont le plus souvent diagnostiqués après une large dissémination de la tumeur. Dans le cas où l'ablation chirurgicale est impossible, le traitement de choix implique la chimiothérapie et la radiothérapie.

Cependant, ces modes de traitements ont une faible efficacité clinique et des effets secondaires importants. En conséquence, beaucoup d'efforts ont été consacré ces dernières années à développer de nouvelles stratégies pour le traitement du cancer du poumon, en particulier les immunothérapies. Deux stratégies d'immunothérapie principales conduisant à la génération de cellules T effectrices capables de reconnaître les cellules tumorale ont été développées : la vaccination et le transfert adoptif de lymphocytes T. Néanmoins, leur succès semble être rare et dépend fortement de la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale adaptative efficace. Cependant, l'efficacité des deux approches n'est toujours pas satisfaisante. Ceci peut être dû à l'incapacité des lymphocytes T générés à infiltrer les tumeurs ou des stratégies développées par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immunitaire.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à étudier le rôle de CD103 dans les mécanismes impliqués dans le recrutement des lymphocytes T spécifiques de la tumeur et leur maintien sur le site de la tumeur, leur comportement migratoire ainsi que l'acquisition de fonctions effectrices indispensables pour la destruction de la tumeur, dans un modèle de

CBNPC, *in situ* chez l'homme et *in vivo* chez la souris. Plusieurs groupes, y compris le nôtre, ont fourni des preuves pour le développement d'une réponse immunitaire dans les CBNPC et ont démontré que les CTL spécifiques de tumeurs peuvent contribuer à la régression de la tumeur (Echchakir, Asselin-Paturel et al. 1999 ; Echchakir, Vergnon et al. 2000).

Les CTL sont des acteurs clés de la réponse immunitaire antitumorale et antivirale. Elles polarisent et secrètent des granules lytiques contenant de la perforine et du granzyme-B qui induisent la mort de la cellule cible (Bossi, Trambas et al. 2002). La lyse des cellules cibles est induite suite à l'engagement du TCR et de co-récepteurs activateurs telles que les intégrines. En effet, les intégrines, en particulier LFA-1 jouent un rôle important dans l'induction de l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques. Des études ont montré que l'intégrine LFA-1 a un rôle important dans le déclenchement de l'activité cytotoxique des CTL suite à l'interaction avec son ligand ICAM-1. Cette interaction est essentielle pour activer la polarisation des granules cytotoxiques et leur exocytose qui entraîne la mort des cellules cibles (Anikeeva, Somersalo et al. 61). En plus de LFA-1, l'intégrine CD103 ($\alpha_E\beta_7$), qui est exprimée par les cellules T CD8⁺ intraépithéliales, joue un rôle important dans la lyse des cellules cibles épithéliales. L'interaction de la E-cadherine, qui est exprimée par les cellules tumorales épithéliales, avec CD103 exprimée à la surface des TIL spécifiques de la tumeur engendre la polarisation des granules cytotoxiques vers l'interface de la SI et la libération de ces derniers dans les cellules cibles entraînant leur mort.

Mon équipe a montré que l'interaction de CD103 avec son ligand, la E-cadherine, induit non seulement l'activité cytotoxique, en facilitant l'adhésion des cellules T effectrices à leurs cibles tumorales spécifiques (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2013), mais déclenche aussi de signaux de costimulation qui induisent l'activation des CTL en coopération avec les signaux exercés par le TCR (Le Floc'h, Jalil et al. 2011). Par ailleurs, il a été décrit que l'interaction de CD103 avec son ligand facilite la rétention des lymphocytes T effecteurs/mémoires dans les tissus épithéliaux, dans des conditions normales et pathologiques (Gorfu, Rivera-Nieves et al. 2009). De plus, l'intégrine CD103 a été décrite aussi comme un marqueur des cellules T mémoires résidentes dans les tissus (Trm), et leur accumulation dans les tissus épithéliaux suggère fortement que CD103 est directement impliquée dans leur rétention.

Les Trm CD103⁺ ont un rôle crucial dans la protection des tissus épithéliaux humains contre les infections virales. Cette population exprime les marqueurs de l'*exhaustion* comme CTLA-4 et PD-1 qui induit leur épuisement et un état d'anergie (Wakim, Woodward-Davis et al.

2012; Mackay, Rahimpour et al. 2013). A ce jour, aucune information n'a montré l'existence des Trm dans les tumeurs épithéliales humaines et leur rôle dans la réponse immunitaire antitumorale. Dans ce contexte, mes travaux ont consisté à analyser si les TIL CD8⁺/CD103⁺ des CBNPC humains appartiennent à cette catégorie de cellules mémoires, s'ils sont spécifiques de la tumeur et à déterminer le rôle des récepteurs inhibiteurs dans la régulation de leur activité intratumorale. Mes résultats ont montré que les TIL CD8⁺/CD103⁺ ont un phénotype caractéristique des Trm, qu'ils sont dans un état d'épuisement de par l'expression de récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3 et qu'ils exercent une activité cytotoxicité antitumorale suite à la neutralisation de l'interaction PD-1/PD-L1. Mes résultats ont montré aussi que l'intégrine CD103 favorise le recrutement de TIL à l'intérieur des îlots épithéliaux et qu'une forte infiltration de la tumeur avec des TIL CD103⁺ est associée à une meilleure survie des patients atteints de CBNPC. Dans un premier temps, mes données ont confirmé que CD103 est principalement exprimée sur les Trm CD8⁺ de phénotype *exhausted*. Dans un second temps, j'ai montré que CD103 est un bon marqueur de survie chez les patients atteints de CBNPC. Une observation similaire a été récemment décrite dans le cadre d'une étude sur le cancer de l'ovaire ce qui confirme mes résultats (Webb, Milne et al. 2014).

Dans un seconds temps, je me suis intéressé au rôle de CCL5 et de CD103 dans le recrutement et la rétention des TIL dans le site primaire de la tumeur développée dans les CBNPC. En effet, CCR5, le récepteur de CCL5, joue un rôle important dans la migration des cellules T au site tumoral (Uekusa, Yu et al. 2002; Franciszkiewicz, Le Floch et al. 2009). De plus, la production de ces ligands CCL5 ou CCL3 par les cellules tumorales induit le recrutement sélectif des cellules T CD8⁺ (Mule, Custer et al. 1996) (Gough, Crittenden et al. 2005). Ainsi, l'expression intratumorale de CCL5 peut donc constituer un facteur favorisant l'infiltration des lymphocytes T. De plus, les chimiokines peuvent également fournir un signal de co-stimulation des cellules T résultant en une potentialisation de leurs fonctions effectrices (Franciszkiewicz, Le Floch et al. 2009). De manière intéressante, l'expression de CD103 *in vivo* par des TIL isolés de tumeurs pulmonaires murines est associée à un mauvais pronostic, car CD103 est exprimé principalement sur les TIL CD4⁺, contrairement à l'homme où CD103 est majoritairement sur les T CD8⁺ dans les tumeurs CBNPC. En revanche, CD103 est exprimée de manière similaire chez la souris lorsque les TIL sont issus de tumeurs transfectées avec la E-cadherine et CCL5. Cela confirme le rôle de CCL5 dans le recrutement des TIL au site tumoral, et le rôle de CD103 dans la rétention de ces cellules au site tumoral épithélial où la E-cadherine est exprimée. Cet aspect n'est pas observé chez les souris

déficientes pour CD103. L'ensemble de ces résultats montrent que CD103 peut être un bon comme un mauvais facteur de pronostic en fonction de sa distribution cellulaire dans les différents modèles de cancer.

1. Caractérisation des *Trm* T CD8⁺/CD103⁺

La compréhension du rôle des molécules d'adhérence, notamment les intégrines, est indispensable pour le bon fonctionnement des réponses immunitaires induites par les lymphocytes et notamment les CTL. Dans ce contexte, l'intégrine LFA-1 est nécessaire à la formation de la SI mature entre un CTL et sa cible et déclenche ainsi l'activité cytotoxique spécifique de l'Ag (Shaw, Luce et al. 1986). La compréhension des processus d'activation de l'intégrine CD103 représente donc un enjeu important pour améliorer la réponse cytotoxique exercée par les CTL vis à vis des cellules tumorales d'origines épithéliales.

Le rôle de l'intégrine CD103 (Kilshaw and Higgins 2002), dans la réponse CTL antitumorale reste mal connu à ce jour. Cette intégrine est exprimée à des niveaux élevés par les cellules T de la muqueuse, en particulier les lymphocytes de l'épithélium intestinal (IEL) (Kilshaw and Murant 1990). On la retrouve aussi sur les mastocytes des muqueuses, sur les DC (Sung, Fu et al. 2006) et sur une grande proportion de cellules T CD8⁺ infiltrant les tumeurs épithéliales, comme le cancer de la vessie (Cresswell, Wong et al. 2002), le cancer colorectal (Quinn, Hawkins et al. 2003), le cancer du pancréas (Ademmer, Ebert et al. 1998) et les carcinomes du poumon (Le Floc'h, Jalil et al. 2007) et la présente étude). En revanche, seul un très petit nombre de PBL de patients atteints de CPNPC et de donneurs sains exprime CD103. Cette intégrine est induite à la surface des LT CD8 suite à la migration au site tumoral et à l'engagement du TCR par la reconnaissance du complexe peptide antigénique/CMH-I en présence du TGF-β1 abondant dans la tumeur (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009; Mokrani, Klibi et al. 2014). En effet, le co-engagement du TCR et du récepteur au TGF-β, est essentiel pour l'expression de CD103 à la surface des cellules T CD8⁺. Plus précisément, mon équipe a mis en évidence que les facteurs transcriptionnels Smad2, Smad3 et NFAT-1 régulent l'expression du gène ITGAE. En plus, deux séquences régulatrices du gène ITGAE ont été identifiées, le promoteur proximal où se fixe la protéine Smad3 et un Enhancer où se fixent les facteurs Smad3 et NFAT-1 (Mokrani, Klibi et al. 2014).

C'est dans ce contexte que j'ai analysé la distribution cellulaire de CD103 dans les CBNPC. Mes résultats ont montré que CD103 est exprimé faiblement dans les DC (< 20%) et plus

majoritairement dans les TIL CD3⁺. De manière intéressante, CD103 est essentiellement exprimée sur les T CD8⁺. En effet, seule une petite population de T CD4⁺ exprime l'intégrine, celle-ci peut inclure des Treg ou des Th17. En effet, des études ultérieures ont montré une expression de l'intégrine par des cellules Treg CD4⁺/CD25⁺ et CD4⁺/CD25⁻ (Lehmann, Huehn et al. 2002 ; Annacker, Coombes et al. 2005). Les lymphocytes Treg expriment le marqueur Foxp3. La régulation de l'expression de ce facteur de transcription est similaire à celle du gène ITGAE qui code pour CD103. En effet, CD103 et Foxp3 sont tous les deux induits après activation des lymphocytes T par une combinaison de TGF-β1 et d'Ac anti-CD3. De manière intéressante, une sous-population de lymphocytes Treg a été décrite co-exprimant CD103 et Foxp3 (Anz, Mueller et al. 2011). Ces cellules seraient générées grâce à l'engagement du TCR suite à la reconnaissance de complexes peptides tumoraux-CMH-II et dans ce cas CD103 aurait un rôle de rétention des Treg au site tumoral (Suffia, Reckling et al. 2005).

Des études antérieures ont identifié CD103 comme marqueur de Trm T CD8⁺ qui persistent sur les sites de contact de l'Ag, même longtemps après la neutralisation de l'agent pathogène (Bevan 2011 ; Sheridan and Lefrancois 2011 ; Gebhardt, Mueller et al. 2013). Dans ce contexte, j'ai analysé le profil des TIL CD8⁺/CD103⁺ par RT-qPCR et par cytométrie de flux. Mes résultats ont montré que les tumeurs CBNPC sont infiltrées par une population de TIL CD8⁺ qui se caractérise par une signature phénotypique de type Trm. En effet, les TIL CD8⁺ expriment majoritairement CD69, et CD103 et sont CCR7⁻. Des études ont montré que l'intégrine CD103 a un rôle important dans la rétention des Trm dans les tissus épithéliaux grâce à son interaction avec son ligand la E-cadherine. De plus, le TGF-β1, présent en abondance dans les tissus épithéliaux de l'intestin, favorise la rétention des Trm de part l'induction de CD103 et CD69 (Zhang and Bevan 2013). A ce jour, aucune étude n'a identifié clairement le ligand de CD69 (Kovalova, Ledvina et al. 2010). En revanche, une étude a montré une interaction entre CD69 avec S1P1, un récepteur pour la sphingosine phosphate-1, qui induit la sortie des cellules T des organes lymphoïdes (Matloubian, Lo et al. 2004; Shiow, Rosen et al. 2006; Cyster and Schwab 2012). De ce fait, la perte d'expression de S1P1 semble être un bon marqueur de Trm CD8⁺/CD103⁺ de la peau (Mackay, Rahimpour et al. 2013) et est nécessaire pour la rétention des Trm dans les tissus périphériques (Skon, Lee et al. 2013). De la même manière, les analyses de puces à ADN ont montré que les TIL isolés de tumeurs CBNPC ont une signature moléculaire caractéristique des Trm avec des niveaux élevés de RGS1, ICOS et des gènes codant pour des récepteurs inhibiteurs comme PD-1, CTLA-4 et

Tim-3, ainsi que Sac-3 et les facteurs de transcription EGR1 et NR4A2 (Wakim, Woodward-Davis et al. 2012 ; Mackay, Rahimpour et al. 2013) et au contraire une baisse de S1P1. RGS1 joue un rôle non seulement dans l'atténuation de l'activité de signalisation des protéines G activées par liaison au GTP (Druey, Blumer et al. 1996), mais également dans la rétention des cellules Trm de la peau lors de l'infection par le HSV (Mackay, Rahimpour et al. 2013). De plus, la comparaison du profil génétique des TIL aux PBMC montreront une diminution de l'expression génique de l'intégrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) dans les TIL. Cette intégrine a un rôle dans le maintien des cellules T dans les tissus qui expriment ses ligands ICAM et sa perte d'expression peut être associée à la sécrétion du TGF- β 1 par les tumeurs.

Les Trm sont des lymphocytes T de phénotypes mémoires qui sont nichés au niveau de nombreux tissus périphériques, comme l'intestin (Masopust, Choo et al. 2010 ; Zhang and Bevan 2013), le cerveau (Wakim, Woodward-Davis et al. 2010), la peau (Gebhardt, Wakim et al. 2009), les amygdales (Woodberry, Suscovich et al. 2005) et les poumons (Piet, de Bree et al. 2011), et ne reviennent pas à la circulation suite à l'élimination du pathogène. Une étude de vaccination antivirale a montré l'importance des Trm dans la protection contre les infections virales dans les tissus périphériques, grâce à la prévention des infections locales exercée par les lymphocytes T CD8⁺/CD103⁺ (Jiang, Clark et al. 2012). De manière intéressante, une étude a révélé le rôle des cellules T CD8⁺/CD103⁺, lors de rejets de greffes, dans la défense immunitaire contre toute infection qui apparaîtrait après la transplantation (Turner, Gordon et al. 2014). De plus, les lymphocytes T CD8⁺/CD103⁺ sont responsables des lésions tubulaires rénales après une transplantation allogénique et la destruction des allogreffes au cours de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Hadley, Bartlett et al. 1997 ; Feng, Wang et al. 2002 ; Wong, Robertson et al. 2003 ; Hadley 2004 ; El-Asady, Yuan et al. 2005 ; Zhou, Ueta et al. 2008 ; Liu, Anthony et al. 2011).

De manière similaire, les études par cytométrie en flux ont montré des TIL CD8⁺/CD103⁺ issus de CBNPC ont un phénotype spécifique aux Trm. De plus ces cellules sont capables d'exercer une activité cytotoxique à l'encontre des cellules tumorales autologues après réactivation *in vitro* avec de faibles quantités d'IL-2 et suite à la neutralisation du récepteur inhibiteur PD-1. De plus, cette fonction lytique est inhibée avec un Acm Anti-CD103 bloquant. Ces résultats confirment l'hypothèse que CD103 est un marqueur de cellules T spécifiques de la tumeur et qu'il est induit lors de l'entrée des LT CD8⁺ dans le microenvironnement tumoral par le TGF- β 1 suite à l'interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH-I (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). Le maintien d'une forte expression

de CD103 dans les TIL nécessite probablement une sécrétion continue de TGF- β 1 et à la présence de l'Ag tumoral dans le microenvironnement. Dans ce cadre, mon équipe a montré que l'expression de CD103 sur des clones TIL CD8⁺ peut être maintenue grâce à des stimulations avec des cellules nourricières exprimant l'Ag tumoral spécifique ou l'ajout de TGF- β 1 recombinant (Le Floc'h, Jalil et al. 2007). De façon intéressante, une étude dans un modèle de stomatite vésiculaire a montré que CD103 est exprimée uniquement sur les T CD8⁺ spécifiques du virus lorsque l'antigène est présent (Wakim, Woodward-Davis et al. 2010). De la même manière, CD103 est exprimée sur les lymphocytes T spécifiques du virus grippal, mais pas sur les lymphocytes T spécifiques du cytomégalovirus ou du virus Epstein-Barr, montrant qu'une quantité suffisante d'antigène est nécessaire au maintien de son l'expression (Piet, de Bree et al. 2011).

2. Nouvelle propriété des Trm T CD8⁺/CD103⁺ : phénotype *exhaustion*.

Ces dernières années, des études ont identifié de nouvelles molécules dite récepteurs de points de contrôle « *checkpoints* » qui ont un rôle dans la maintenance de la tolérance au soi et dans la régulation de la réponse immunitaire dans les tissus périphériques (Pardoll 2012). Ainsi, les molécules PD-1, Tim-3 et CTLA-4 sont impliquées dans l'épuisement des lymphocytes T dans les infections virales chroniques (Freeman, Wherry et al. 2006 ; Trautmann, Janbazian et al. 2006 ; Kaufmann, Kavanagh et al. 2007; Blackburn, Shin et al. 2008 ; Takamura, Tsuji-Kawahara et al. 2010 ; Zinselmeyer, Heydari et al. 2013) et la progression tumorale (Zou and Chen 2008. Une coexpression de PD-1 et de Tim-3 sur les lymphocytes T CD8⁺ épuisés peut aussi induire la mort cellulaire (Jones, 2008 #863 ; Fourcade, Sun et al. 2010 ; Sakuishi, Apetoh et al. 2010; Takamura, Tsuji-Kawahara et al. 2010). En effet, au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses utilisent la voie PD-1/PD-L1 pour échapper à la réponse immunitaire suite à l'induction de la mort par apoptose des cellules T CD8 (Dong, Strome et al. 2002).

Durant ma thèse, j'ai analysé l'expression de ces récepteurs sur les TIL CD8⁺/CD103⁺. Les résultats montrent que les TIL CD103⁺ co-expriment PD-1 et Tim-3. Des résultats similaires ont été obtenus dans les TIL issus de mélanome (Inozume, Hanada et al. 2010). Actuellement, les Ag reconnus par la grande majorité des TIL de cancers pulmonaires restent encore mal définis. Nos résultats suggèrent fortement que CD103 définit les TIL qui sont spécifiques de la tumeur. Ainsi CD103 peut servir de marqueur pour définir les TIL spécifiques de la tumeur

et les isoler pour des fins thérapeutiques. En plus de son utilité potentielle en tant que marqueur pronostique et d'outil pour identifier les Ag spécifiques de tumeurs, CD103 correspond à un marqueur de surface pratique pour étudier les TIL intraépithéliaux antitumoraux. Les cellules T CD8⁺/CD103⁺ ont été décrites avoir des propriétés régulatrices/immunosuppressives (Uss, Rowshani et al. 2006). Toutefois, l'expression de PD-1 et Tim-3 par les TIL CD8⁺/CD103⁺ pourrait également signifier leur réactivité vis-à-vis de la tumeur et un épuisement fonctionnel (Galon, Pages et al. 2012). En effet, les TIL CD103⁺ sont retenues au sein du microenvironnement tumoral grâce aux interactions avec la E-cadhérine, exprimée sur les cellules tumorales et une stimulation chronique par l'Ag conduit à leur épuisement. Le fait que ces cellules expriment des niveaux élevés de PD-1 et Tim-3 conduit à une inhibition de leur activité antitumorale et leur blocage avec des Acm neutralisant conduit à la levée de cette inhibition.

La mort prématurée des CTL par AICD correspond à l'une des contraintes majeures limitant la mise en place d'une réponse CTL protectrice spontanée (Yee, Thompson et al. 2002 ; Rosenberg, Restifo et al. 2008). Plusieurs études ont pu mettre en évidence une corrélation positive entre la survie des lymphocytes T CD8⁺ transférés et la régression de la tumeur observée chez des patients atteints de mélanome (Dudley, Wunderlich et al. 2002 ; Robbins, Dudley et al. 2004). Plusieurs stratégies ont par conséquent été développées pour protéger les lymphocytes T CD8⁺ de la mort par apoptose et améliorer ainsi l'efficacité des différents protocoles d'immunothérapie actuels. L'AICD est un mécanisme apoptotique déclenché suite à une hyperactivation cellulaire. Elle est impliquée dans le contrôle de l'expansion des cellules T activées, suite à l'engagement du TCR et dans l'induction d'une tolérance lymphocytaire (Lenardo, Chan et al. 1999). Mes résultats ont montré que la sous-population CD8⁺/CD103⁺ est plus sensible à l'AICD que la population CD8⁺/CD103⁻. Afin de protéger cette sous-population CD103⁺, j'ai utilisé des Ac neutralisants dirigés contre le récepteur inhibiteur PD-1. Mes résultats ont montré une inhibition partielle de l'AICD et la protection des TIL CD103⁺ de la mort par apoptose. De manière plus intéressante, mes résultats ont montré que le traitement avec des Acm Anti-PD-1 neutralisant potentialise des TIL CD103⁺ vis-à-vis des cellules tumorales autologues. Ces résultats valident l'hypothèse que les TIL CD103⁺ sont plus activés que les TIL CD103⁻ et que la neutralisation de la voie PD-1/PD-L1 optimise l'activité cytotoxique des TIL CD103⁺ spécifiques de l'Ag tumoral. Des études ont montré l'impact de la liaison de PD-1, souvent exprimée sur les TIL spécifiques de l'Ag tumoral, avec son ligand PD-L1 sur les cellules malignes, sur l'activation des lymphocytes T

(Freeman, Long et al. 2000 ; Yokosuka, Takamatsu et al. 2012). En effet, la voie PD-1/PD-L1 conduit à l'échappement tumoral. De ce fait, elle correspond à une cible thérapeutique idéale pour améliorer l'immunité antitumorale.

Mon équipe a montré que les TIL expriment les récepteurs de chimiokines CCR5 et CCR6 et que CCR5 permet probablement aux LT CD8 de migrer vers la tumeur. Toutefois, le rôle de CCR6, induit dans la tumeur, n'est pas connu mais permet vraisemblablement la migration des TIL au sein de la tumeur notamment du stroma vers la zone intratumorale (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). Mes travaux ont montré que les TIL CD8⁺/CD103⁺ expriment des niveaux élevés de CCR5 et CCR6 suggérant leur implication dans la migration des TIL vers la tumeur et au sein de la tumeur, respectivement. Ces résultats sont dans la continuité des travaux précédemment obtenus par mon équipe montrant que le recrutement de CD103 et CCR5 dans la SI formée entre les TIL et les cellules cancéreuses spécifiques participe, au moins en partie, à la rétention des lymphocytes T dans la tumeur en bloquant la migration des lymphocytes vers un gradient de CCL5 (Franciszkiewicz, Le Floc'h et al. 2009). En effet, le ligand de CCR5, CCL5, est l'une des principales chimiokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire antitumorale (Mule, Custer et al. 1996). Dans ce cadre, des études *in vivo* menées chez la souris ont montré que CCL5 potentialise la réponse immunitaire antitumorale (Uekusa, Yu et al. 2002 ; Gough, Crittenden et al. 2005 ; Nakazaki, Hase et al. 2006 ; Liu, Lou et al. 2008). De même, chez l'homme, la production intratumorale de CCL5 et CCL3 favorise le recrutement des TIL CD8⁺ et par conséquent, le contrôle de la progression tumorale (Johrer, Pleyer et al. 2008). De plus, une perte ou une diminution de CCR5 est associée à une diminution de l'infiltration de TIL CD8⁺, qui est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers colorectaux (Zimmermann, Moehler et al. 2010) et du sein (Manes, Mira et al. 2003) et à une diminution de l'efficacité de l'immunothérapie chez des patients atteints de mélanome (Ugurel, Schrama et al. 2008).

3. L'intégrine CD103 marqueur de bon pronostic

Des études ont montré que les TIL sont fortement associés à la survie des patients dans de nombreux cancers épithéliaux (Jochems and Schlom 2011). Cependant, les mécanismes qui favorisent leur localisation dans les régions l'épithéliales de la tumeur restent mal compris. Mes travaux ont montré que l'expression CD103 est une caractéristique commune des TIL CD8⁺ intraépithéliaux dans le cancer CBNPC. De plus, une forte infiltration des tumeurs avec les TIL CD103⁺ est associée à la survie des patients. Les analyses de l'expression de CD103,

dans une cohorte de 101 patients atteints de CBNPC, montre une variation du nombre de cellule positive de 2 à 697 dans les zones tumorales d'un patient à un autre. Cette variation n'est pas bien expliquée, mais elle peut être due à une variation dans la quantité du TGF- β 1 sécrété au niveau de la tumeur ou des molécules impliquées dans l'activation de cette cytokine, notamment les intégrines α v (Katoh, Nagaharu et al. 2013). La variabilité de l'expression de CD103 dans les TIL peut refléter aussi des différences inter-patients du nombre de précurseurs T spécifiques des Ag tumoraux. Ainsi, le TGF- β 1, qui est plutôt considéré comme une cytokine immunosuppressive, peut avoir un rôle dans la réponse immunitaire contre les infections virales et les tumeurs par induction de CD103 et la formation de cellules T_{rm} CD8⁺/CD103⁺. Il a été décrit que les muqueuses intestinales contiennent des IEL résidents qui expriment CD103 en réponse à une stimulation antigénique et la sécrétion locale de TGF- β (Sheridan and Lefrancois 2010). La rétention des IEL suite à les interactions entre l'intégrine CD103 et la E-cadhérine (Sheridan and Lefrancois 2011) est confirmée grâce aux travaux effectuées dans la souris CD103-Ko où une diminution des IEL dans les muqueuses intestinales est observée (Schon, Arya et al. 1999). De plus, des études ont montré que le rejet d'allogreffes est causé par l'infiltration des tissus greffés par les cellules T CD8, qui induisent CD103 lors de l'exposition au TGF- β 1 dans le microenvironnement (Hadley, Bartlett et al. 1997). Dans les allogreffes d'îlots pancréatiques, on observe une persistance des tissus greffés dans les souris déficientes pour CD103 en raison d'une diminution de l'infiltration des cellules T (Feng, Wang et al. 2002).

Le concept que CD103 est un marqueur de cellules T spécifiques de l'Ag est en outre démontré par des études récentes montrant la localisation des cellules T CD8⁺/CD103⁺ spécifiques du virus de la grippe dans le poumon humain (Piet, de Bree et al. 2011) et des cellules spécifiques de l'EBV dans les amygdales (Woodberry, Suscovich et al. 2005), et de l'antigène NY-ESO-1 dans le cancer de l'ovaire (Webb, Wick et al. 2010). Dans les CBNPC, les lymphocytes T CD103⁺ sont spécifiques de la tumeur. J'ai montré que les TIL CD103⁺ expriment des niveaux élevés de PD-1, ce dernier étant défini comme un biomarqueur de cellules T spécifiques de la tumeur dans le mélanome (Inozume, Hanada et al. 2010). Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle CD103 est exprimée essentiellement par les TIL spécifiques de l'Ag tumoral. De manière intéressante, mes résultats ont montré qu'une infiltration tumorale élevée par les TIL CD103⁺ corrèle avec meilleure survie des patients atteints de CBNPC, ceci quelque soit leur emplacement dans l'épithélium tumoral ou dans des

régions stromales. Une étude récente a montré qu'une forte expression de CD103 par les TIL est associée également à une meilleure survie des patients atteintes de cancer de l'ovaire (Webb, Milne et al. 2014). De plus, mes résultats ne montrent aucune corrélation n'a été trouvée entre l'infiltration des TIL CD8⁺ de la tumeur avec la survie des patients, à moins s'ils sont localisés dans les régions tumorales épithéliales. Enfin, mes résultats ont montré que CD103 joue un rôle important dans le recrutement de lymphocytes T CD8⁺ dans les amas tumoraux. Ainsi, cette intégrine correspond à un biomarqueur de cellules T spécifiques de l'Ag tumoral autologues activées *in situ*. En effet, la sous-population T CD8⁺/CD103⁺ est capable de lyser les cellules tumorales suite au blocage de l'interaction du récepteur inhibiteur PD-1 avec son ligand. Les TIL CD8⁺/CD103⁺ peuvent donc être considérés comme des acteurs clés dans la fonction de CTL antitumoraux des lésions épithéliales tumorales. En effet, des travaux récents tentent de valider la signification pronostique de TIL, tel que défini par le concept d'*Immunoscore* (Galon, Pages et al. 2012). Le but ultime de ces travaux est d'amener l'*Immunoscore* dans la pratique clinique standard en tant que biomarqueur pronostic. La forte association entre les TIL CD8⁺/CD103⁺ intraépithéliaux et la survie des patients atteints de CBNPC est d'un intérêt majeur dans l'utilisation de ces TIL en tant que biomarqueurs pronostiques et prédictifs et en tant que cellules effectrices pour une immunothérapie antitumorale. Nous proposons que l'intégrine CD103 soit un marqueur spécifique des cellules T CD8⁺ antitumorales, qui va permettre d'augmenter considérablement notre compréhension de leur contribution dans la réponse immunitaire antitumorale, de cette sous-population et potentiel de son utilisation en immunothérapie.

4. Rôle de CD103 dans la réponse CTL *in vivo*.

Plusieurs groupes ont apporté des preuves d'une surveillance des tumeurs par le système immunitaire. L'infiltration des tumeurs par des lymphocytes T, NK ou NKT est associée à un meilleur pronostic dans plusieurs cancers, notamment dans le mélanome. De plus, il a été montré que les patients atteints de mélanome présentant une forte infiltration tumorale avec des lymphocytes T ont un meilleur taux de réponse aux traitements immunothérapeutiques (Haanen, Baars et al. 2006). Ces données ont souligné un rôle crucial des CTL dans le contrôle de la progression de la tumeur (Clark 1991 ; Clemente, Mihm et al. 1996 ; Dudley and Rosenberg 2003 ; Rosenberg and Dudley 2004). Pour exercer leurs fonctions effectrices antitumorales, les CTL générés doivent migrer et infiltrer la tumeur. L'incapacité des

effecteurs cytotoxiques à atteindre leurs cibles tumorales représente l'un des facteurs limitant de l'efficacité de la réponse immunitaire antitumorale.

Dans ce contexte, j'ai développé un modèle *in vivo* fondé sur la greffe de la lignée murine de cancer pulmonaire LL2, dans des souris C57BL/6. Jusqu'à présent, le seul ligand connu de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ est la E-cadhérine (Cepek, Shaw et al. 1994 ; Corps, Carter et al. 2001), qui est exprimée par les cellules épithéliales formant des liaisons homotypiques entre les cellules adjacentes. La E-cadhérine est connue pour posséder une fonction suppressive de tumeur (Frixen, Behrens et al. 1991) et une expression réduite d'E-cadherine a été observée au cours du développement tumorale et l'invasion métastatique de nombreuses tumeurs épithéliales (Vleminckx, Vakaet et al. 1991 ; El-Hariry, Jordinson et al. 1999). Mon travail a consisté à transfecter les cellules tumorales LL2 avec la E-cadhérine pour étudier le rôle de l'interaction CD103/E-cadherine dans la progression tumorale et dans la rétention des cellules T au niveau du site tumoral. Mes résultats ont montré que la transfection de LL2 avec la E-cadhérine seule induit un développement plus rapide de la tumeur et que la transfection avec CCL5 seule n'est pas suffisante pour inhiber la progression tumorale. Mes données ont montré aussi que la cotransfection de LL2 avec la E-cadhérine et CCL5 induit une diminution significative de la croissance tumorale qui corrèle avec une augmentation du nombre des cellules immunitaires au sein du site tumorale. Ces résultats suggèrent un effet synergique de CCL5 et la E-cadhérine sur l'infiltration, sur la rétention lymphocytaire et sur l'inhibition de la croissance tumorale. Ces données suggèrent également que la coexpression de la E-cadhérine et CCL5 peut contribuer à la destruction de la tumeur, non seulement par l'accumulation et la localisation appropriée des cellules T effectrices, mais aussi par la création d'un microenvironnement favorable pour l'induction d'une réponse cytotoxique antitumorale. Il convient de souligner que l'effet inhibiteur de la E-cadhérine combiné à CCL5 sur la croissance tumorale n'est pas due à une de prolifération plus lente de lignées LL2 cotransfectée avec les 2 molécules, comme je l'ai vérifié *in vitro*. Ainsi l'interaction de l'intégrine $\alpha_E\beta_7$ sur les TIL avec la E-cadhérine sur les tumeurs épithéliales correspond à un mécanisme fondamental non seulement pour les fonctions effectrices de CTL, mais aussi pour le maintien des lymphocytes T spécifiques de l'Ag tumoral dans les tumeurs épithéliales. En contrôlant la rétention des cellules T réactives à la tumeur et leur activité cytotoxique, CD103 peut contribuer à une réponse immunitaire antitumorale plus efficace. La perte d'expression de la E cadhérine par les cellules tumorales peut entraîner une défaillance de la réponse antitumorale locale, mais aussi peut inhiber l'accumulation de cellules T spécifiques de la

tumeur au sein du microenvironnement tumorale. Une meilleure compréhension des mécanismes de rétention des CTL dans le site de la tumeur offrira de nouvelles possibilités d'optimisation des stratégies d'immunothérapie actuelles. De plus, la différence de la progression tumorale dans les souris sauvages et les souris déficientes pour CD103 peut être expliquée par l'expression de CD103 majoritairement sur les TIL CD4⁺. Dans ce modèle particulier, CD103 peut entraîner la rétention des lymphocytes Treg dans le microenvironnement tumoral et induire ainsi un effet immunosuppresseur qui faciliterait l'échappement tumoral dans les souris CD103-WT par rapport à la souris CD103-KO. Néanmoins, Les travaux d'Anz et col (2011) ont montré que CD103 n'est pas impliquée dans la rétention des Treg ceci en utilisant un Ac anti-CD103. Cette équipe a montré aussi que le TGF-β1 favorise l'expression de CD103 dans les Treg, et des niveaux élevés de CD103 dans les tumeurs abondantes en TGF-β1 ont été observés (Anz, Mueller et al. 2011). De plus, l'inhibition *in vivo* du gène codant TGF-β1 réduit le nombre intratumoral de Treg CD103⁺. Cette observation est soutenue par les travaux de mon équipe montrant que le TGF-β1 est un puissant inducteur de CD103 *in vitro* (Schon, Arya et al. 1999; Sheridan and Lefrancois 2010) et *in vivo* (Franciszkiewicz, Le Floch et al. 2009). De plus, cette cytokine induit l'expression de CD103 *in vivo* sur les lymphocytes intraépithéliaux au niveau de la *Lamina Propria* et la génération de cellule Treg CD103⁺ à partir de cellules T naïves (Feng, Wang et al. 2002). Par conséquent, le nombre élevé de Treg CD103⁺ infiltrant la tumeur pourrait aussi résulter de la conversion des cellules T naïves. CD103 pourrait représenter un marqueur pour cibler spécifiquement les Treg dans les tumeurs sécrétant du TGF-β1. Ainsi, le développement de nouveaux Ac appauvrissant les tumeurs en cellules Treg CD103⁺ peut-être une approche intéressante pour améliorer les thérapies anticancéreuses, dans la condition de ne toucher à aucune autre population qui pourrait exprimer CD103 tel que les TIL CD8⁺.

5. Analyse de réponse immunitaire antitumorale chez la souris CD103^{-/-}

De nombreuses études ont montré que l'infiltration des tumeurs par des lymphocytes T spécifiques n'est pas toujours associée à une élimination efficace de la tumeur (Yu and Fu 2006). Une meilleure compréhension des bases moléculaires de la réponse immunitaire antitumorale, plus spécifiquement la phase de reconnaissance et la phase effectrice, est donc indispensable au développement de nouvelles approches anticancéreuses plus appropriées. Mes travaux ont montré qu'en l'absence de CD103, la croissance tumorale de la lignée murine LL2 est significativement retardée. Ce contrôle de la progression tumorale montre

qu'une réponse T antitumorale spécifique efficace, au moins transitoire, a été mise en place chez la souris CD103^{-/-}. L'analyse quantitative de l'infiltrat lymphocytaire T a montré que les tumeurs des souris CD103^{-/-} et CD103^{+/+} sont infiltrées par un nombre comparable de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. Afin de caractériser la réponse T antitumorale générée chez la souris CD103^{-/-} et de mieux comprendre les mécanismes exacts impliqués dans le contrôle de la progression tumorale, j'ai procédé à une analyse qualitative des TIL CD103^{-/-} et CD103^{+/+}. Les analyses phénotypiques ont révélé que l'infiltrat lymphocytaire T des souris CD103^{-/-} et CD103^{+/+} est composé majoritairement par des lymphocytes T ayant un phénotype effecteur/mémoire CD28⁺/CD27⁺/CD45RA^{faible}/CD62L^{faible}. Mes résultats sont en accord avec d'autres études in vivo montrant que les lymphocytes T CD8⁺ infiltrant différents modèles tumoraux ont majoritairement un phénotype effecteur/mémoire (Radoja, Saio et al. 2001; Radoja, Saio et al. 2001; Joncker, Marloie et al. 2006). L'efficacité de la réponse immunitaire antitumorale dépend non seulement de l'état de différenciation des lymphocytes T, mais également de leur état d'activation. De manière intéressante, mes résultats ont montré un ralentissement significatif de la croissance tumorale dans les souris déficientes pour l'expression de CD103 comparées à leurs équivalentes sauvages. Le contrôle de la tumeur chez les souris CD103^{-/-} ne semble pas corrélér avec un recrutement plus important de lymphocytes T, mais avec une efficacité accrue de leur réactivité vis-à-vis des cellules tumorales LL2, probablement lié à une efficacité moindre de l'inhibition des cellules T CD8⁺ par les Treg. Comme je l'ai montré précédemment, CD103 est exprimée majoritairement sur les T CD4⁺ et sachant que le rôle principal de cette intégrine est la rétention des lymphocytes T au site tumorale. Notre hypothèse suggère qu'il y a plus de Treg dans les souris CD103-WT que dans les souris CD103-KO, d'où l'effet inhibiteur sur les T CD8⁺ dans les souris sauvages.

CONCLUSION

Les avancées récentes dans notre compréhension de la régulation des fonctions effectrices des cellules T ont permis l'émergence de nouvelles stratégies d'immunothérapie antitumorale. Ainsi, plusieurs thérapies fondées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, tels que l'anti-CTLA-4 ou l'anti-PD1 (Weber 2010 ; Drake 2012), ont montré un bénéfice clinique dans plusieurs cancers. Néanmoins, bien que ces traitements aient permis d'améliorer la survie de certains patients, le taux de réponse reste limité dû aux mécanismes développés par la tumeur pour inhiber les fonctions immunitaires. En effet, les activités fonctionnelles des effecteurs T peuvent être modulées par : i) les cellules Treg recrutées au site tumoral, ii) l'expression à leur surface des récepteurs inhibiteurs, en particulier CTLA-4, PD-1 et Tim-3, iii) la sécrétion par la tumeur de facteurs immunosuppresseurs, tel que TGF- β 1. De manière paradoxale, nous avons démontré, au sein de mon équipe, le rôle majeur de l'intégrine CD103, induite à la surface des TIL CD8⁺ par le TGF- β 1 suite à l'engagement du TCR, pour déclencher leur activité cytotoxique (Le Flo'h, Jalil et al. 2007). En effet, l'interaction de cette intégrine avec son ligand, le marqueur des cellules épithéliales E-cadhérine, à la surface des cellules tumorales est nécessaire à la polarisation et l'exocytose des granules cytotoxiques entraînant la mort de la cellule cible (Franciszkiewicz, Le Flo'h et al. 2009).

Pour mieux comprendre le rôle de l'intégrine CD103 dans réponse CTL antitumorale, j'ai caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les TIL CD8⁺/CD103⁺ de patients atteints de CBNPC. Ensuite, j'ai recherché s'il existe une corrélation potentielle entre l'expression de cette intégrine à la surface des TIL et la survie de patients atteints de CBNPC par la technique de l'immunohistochimie sur coupe de paraffine. Enfin, j'ai étudié le rôle de CD103 dans un modèle *in vivo* de carcinome pulmonaire murin transplanté dans des souris sauvages et déficientes pour l'intégrine CD103.

Mes résultats ont montré que :

1. Les lymphocytes T CD8⁺/CD103⁺ présentent une signature moléculaire caractéristique des cellules T mémoires résidentes dans les tissus (T_{RM}) et ils co-expriment les récepteurs inhibiteurs PD-1 et Tim-3.
2. Ils sont plus sensibles à la mort cellulaire induite par activation (AICD) que les TIL CD8⁺/CD103⁻, et ils expriment le granzyme B et CD107a suite à une activation spécifique.

3. Le blocage de l'interaction de PD-1 avec son ligand PD-L1, induit une activité cytotoxique spécifique à l'encontre des cellules tumorales autologues et la neutralisation de l'intégrine CD103 avec des Acm bloquant inhibe cette fonction lytique.
4. L'intégrine CD103 favorise l'infiltration des TIL dans les régions tumorales épithéliales. Une forte expression de CD103 sur les TIL corrèle avec une augmentation de la survie des patients CBNPC.
5. La distribution de CD103 dans les différentes populations immunitaires infiltrant les tumeurs bronchiques tels que les TIL CD4⁺ dans un modèle murin de tumeur pulmonaire implantée dans des souris syngéniques. Tandis que dans les CBNPC humains, CD103 est essentiellement exprimé sur les LT CD8.
6. La production intratumorale de la chimiokine CCL5 favorise le recrutement des TIL activés et une diminution de la progression tumorale dans mon modèle murin de tumeur pulmonaire LL2.

Mes travaux de recherches ont permis :

- i) Une meilleure compréhension du rôle de l'intégrine CD103 dans la réponse immunitaire antitumorale. Cette intégrine peut être utilisée comme moyen thérapeutique en transfert adoptif pour traiter les patients atteints de tumeurs épithéliales (**Fig. 19**). L'amplification de CD103 permettrait une meilleure rétention des TIL dans la tumeur et une potentialisation de la lyse des cellules cancéreuses. De plus, l'analyse rétrospective de l'immunothérapie adoptive, dans plusieurs essais cliniques, a montré une bonne efficacité en terme de survie.

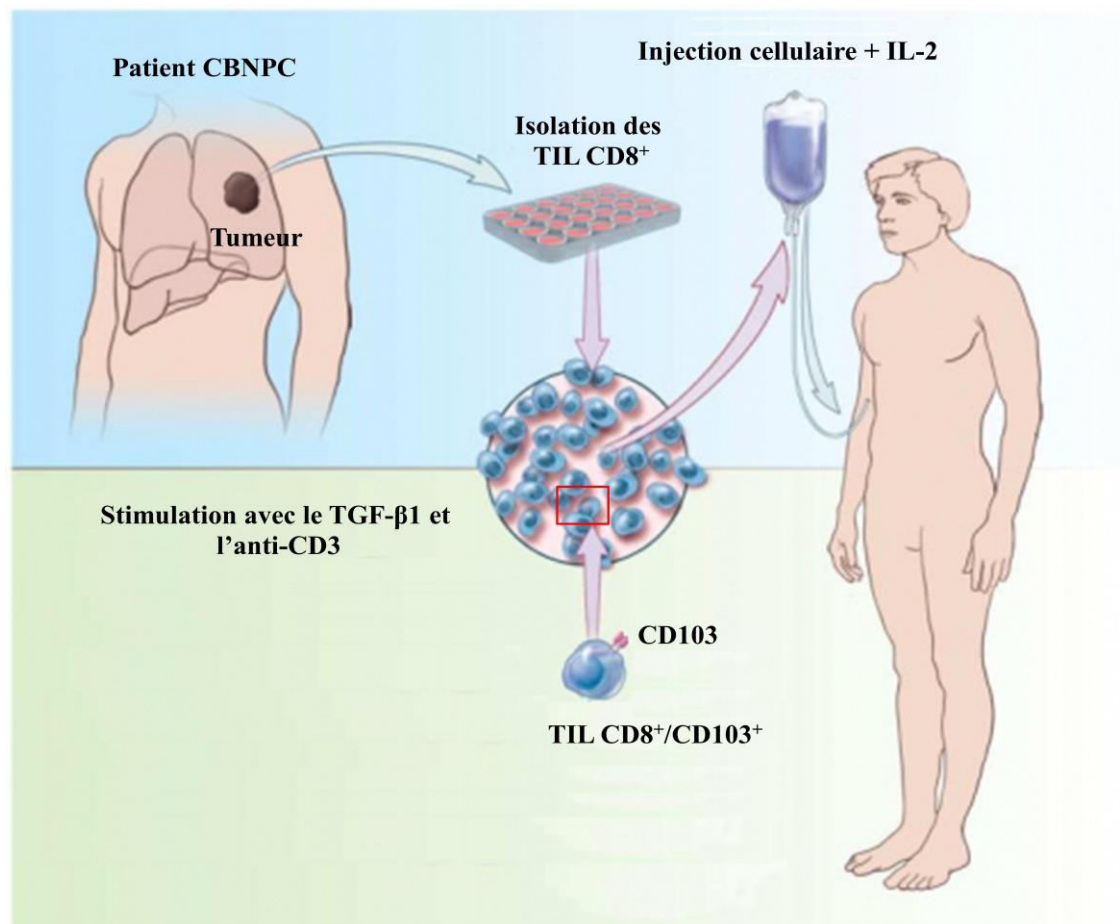


Figure 19. Transfert adoptif des TIL CD8⁺/CD103⁺. Cette approche est basée sur la récupération des TIL CD8⁺ par dissociation mécanique et enzymatique suivie d'une stimulation *in vitro* de CD103 en présence de la molécule recombinante TGF-β1 et d'un anticorps activateur anti-CD3 avant leur injection par voie intraveineuse chez le patient en combinaison avec de IL-2 afin de les maintenir en vie.

- ii) La combinaison de stratégies impliquant d'une part l'activation des lymphocytes T et d'autre part le blocage de l'activité immunosuppressive exercée par des cellules cancéreuses permettrait l'échappement tumoral au système immunitaire, d'améliorer la réponse immunitaire antitumorale et à terme d'éradiquer les tumeurs.
- iii) L'intégrine CD103 pourrait être utilisée comme un marqueur pronostique de survie chez les patients atteints de CBNPC et permettrait de sélectionner les patients pour une éventuelle chimiothérapie à base d'anticorps Anti-PD-1.

- iv) L'expression de CD103 sur les T CD4⁺ dans le modèle murin n'enlève pas du tout de l'intérêt de ce modèle qui pourrait être exploité dans la compréhension des différents mécanismes de régulation de la réponse immunitaire impliquant cette intégrine.
- v) L'exploitation des bases de données génomiques des TIL récupérés de tumeur murine LL2 exprimant soit E-cadherine, soit CCL5 ou les deux, permettrait de comprendre leurs impacts sur le recrutement et la rétention des TIL dans la tumeur.
- vi) L'utilisation de CCL5 en clinique comme un potentiel adjuvant permettrait de stimuler la réponse immunitaire antitumorale (**Fig. 20**).

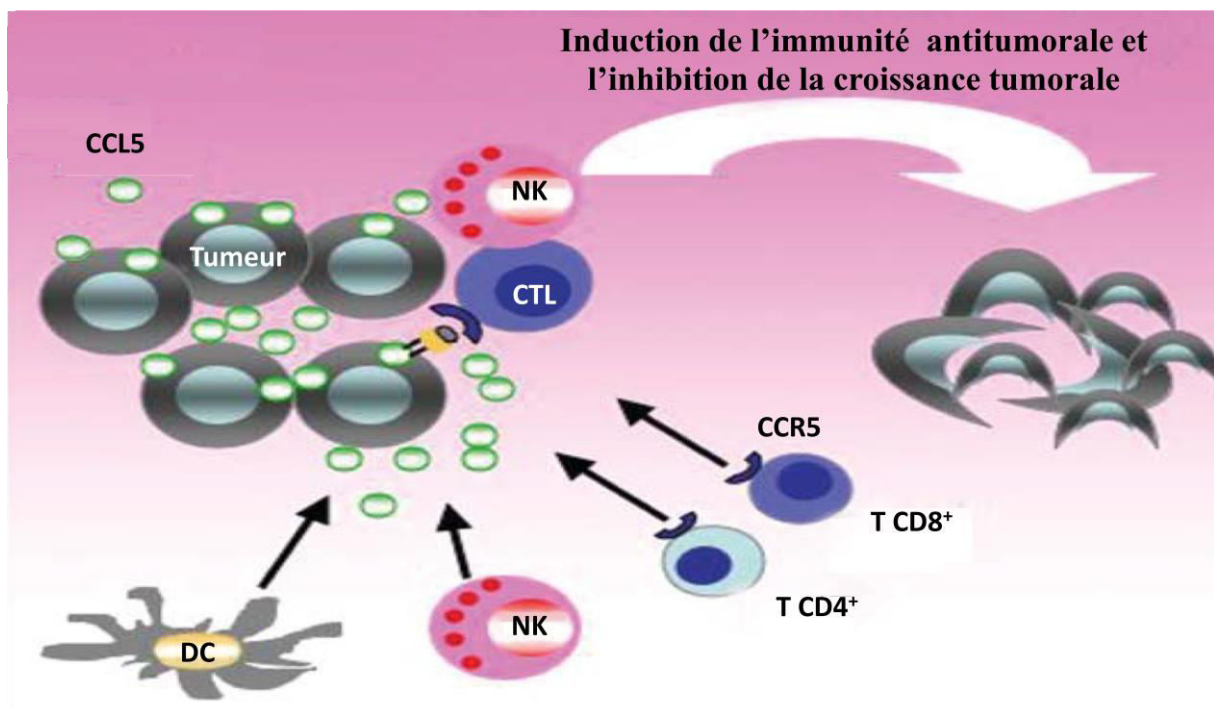


Figure 20. Rôle de la molécule chimioattractant CCL5. la chimiokine CCL5 peut induire la réponse immunitaire antitumorale par le recrutement des cellules du système immunitaire telle que LT CD4, LT CD8, les NK et les DC. L'amplification de l'expression de CCL5 dans la tumeur induit le recrutement des DC qui vont capturer et présenter l'Ag au lymphocyte T CD8⁺. Ces dernières vont se différencier en CTL spécifique de la tumeur. De plus, les DC peuvent promouvoir des cellules Th1 à partir de la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïves.

Les retombées de ce travail sont évidentes pour une meilleure compréhension des interactions entre le système immunitaire et la tumeur et une potentialisation de la réponse antitumorale locale. A plus long terme, ce travail permettrait de proposer des nouvelles approches d'immunothérapie antitumorale pour le traitement du cancer du poumon dont les thérapies conventionnelles se sont souvent avérées peu efficaces.

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Projet 1 :

1. TIL et PBMC de patients

Les tumeurs fraîches (119 patients) ont été obtenues à l'Institut Mutualiste Montsouris (Paris, France) et au Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France). Elles sont immédiatement dissociées mécaniquement et enzymatiquement (Lung Kit de dissociation, Miltenyi Biotec). Ensuite, les TIL ont été soit directement analysés phénotypiquement par cytométrie en flux soit isolés à l'aide d'un trieur de cellules FACS ARIA basé sur la sélection de la petite taille des cellules mononucléaires pour des analyses fonctionnelles. Les PBMC de patients atteints de CPNPC ont été obtenues à l'Institut Gustave Roussy. Ils sont obtenus à partir du sang périphérique par séparation sur un gradient de Ficoll (GeHealthCare). Toutes les expériences ont été approuvées par le Conseil de Gustave Roussy.

2. Technologie des puces à ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir de cellules TIL de patients sélectionnées d'après leur petite taille et des PBMC grâce à l'utilisation du TRIzol (Sigma-Aldrich). Ensuite, la qualité des ARN est contrôlée par bio-analyseur. Une fois les ARN validés, ils sont utilisés sur des puces à ARN (Agilent). La synthèse des sondes et l'étiquetage ont été effectués grâce à un kit à faible amplification de la fluorescence (Agilent). L'hybridation a été effectuée sur l'ensemble du génome humain avec une puce « SurePrint G3 GE 8x60K » (AMADID 28004) en utilisant les réactifs et les protocoles fournis par le fabricant. Le logiciel d'extraction de données, fourni par Agilent (version 10.7.3.1), a été utilisé pour quantifier l'intensité de la fluorescence. Les données ont été normalisées par la méthode quantile « limma Bioconductor R ». L'analyse différentielle de l'expression des gènes a été effectuée avec le test T de « LIMMA modéré ». Le regroupement des gènes sur la base de leurs fonctions ont été effectuées en utilisant Ingenuity Pathway Analysis (IPA) et DAVID Bioinformatique (base de données pour l'annotation, visualisation et découverte intégré, v6.7).

3. RT-PCR quantitative en temps réel

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARNm en utilisant un kit « Applied Biosystems ». L'analyse par PCR en temps réel a été réalisée en utilisant un « LightCycler » et « le LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green ». La spécificité des amplicons de PCR a été confirmée par analyse de la courbe de fusion. L'expression des gènes cibles a été étalonnée par rapport au gène qui code pour l'ARNr de la petite sous-unité 18S. L'expression

relative de gènes testés a été calculé en utilisant la valeur du cycle de seuil cible (Ct) et de la méthode $2^{-\Delta C_t}$. Pour chaque gène, la valeur du CT est la moyenne de trois mesures indépendantes.

Les séquences dirigées contre les gènes cibles sont les suivantes :

Gene	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>RGS1</i>	TCTCTGCTAACCCAAAGG	TTTCATATCCATTCCAAAAGTCT
<i>RALGDS</i>	CACTCCAAGTCCTGTGAC	GATTCCCAGAACTTCTTTTCC
<i>ITGAE</i>	TTCTGTCCAAACCATCCA	TTCTTCACTGCTACAACCT
<i>PDCD1</i>	CAGGATGGTTCTTAGACTCC	GAAGCTCTCCGATGTGTT
<i>LAG3</i>	CAATCATCACAGTGACTCC	AGCGTTCTTGTCCAGATA
<i>CTLA4</i>	GAGTTGACCTTCCTAGATGA	CGGTTCTGGATCAATTACATAA
<i>TNFRSF18</i>	AATTCCACTGCGGAGACC	AGCAGCAGTCTGTCCAAG
<i>HAVCR2</i>	CTACTTACAAGGTCCTCAGA	TGCCACATTCAAACACAG
<i>IL-6</i>	TGGATTCAATGAGGAGACTT	TTCTGGAGGTACTCTAGGTATA
<i>IL-21</i>	GTCTGATGGTCATCTTCTTG	CACTCACAGTTTGTCTCTAC
<i>TNFRSF9</i>	AGGCAGTGTAAGGTGTT	TCGTAAATGTCCCAAAGC
<i>TNFSFR4</i>	CAGCTACAAGCCTGGAGT	GTCCTCACAGATTGCGTC
<i>ICOS</i>	AGTTTTAACAGGAGAAATCAATG	TCAGACTCTTAATGGACACT
<i>HSPA1B</i>	AATCAACACTGCCACCTT	ACATACATTCCCAGCCTTT
<i>HSPA1A</i>	AGTTCTCAATTCCTGTGTTT	ATAGTCGTAAGATGGCAGTATA
<i>CYR61</i>	AGAAGAGTGTCAGAATCAGAA	CCTTAATGCTCCTCAAGAATG
<i>HSPB1</i>	AATCAACACTGCCACCTT	ACATACATTCCCAGCCTTT
<i>GADD45G</i>	GGAGCGTGAAGGACTTAG	ACAGCAGCATCCTTTAGAA
<i>BAG-3</i>	CTCCAGTTCCTTGTCTC	CTTCTGTAGCCACACTCTT
<i>TNFSF9</i>	CCCAAAATGTTCTGCTGAT	AAGAAGACATAGTAGACTCCAG
<i>CCR5</i>	GAGGTATGAGGTCTAGGAAC	TGCTTATTGAATGTGTAGTATGT
<i>RASD1</i>	GGCATTATCTTGTCTGTGATT	TGTTTCGTGTCCATGTTGA
<i>BIRC3</i>	AGTAGCCTGGAGAAGTTG	AGAAGAGTGATGTGTATTAAGC
<i>JUN</i>	GTGACGGACTGTTCTATGA	GGTTACTGTAGCCATAAGGT
<i>EGR1</i>	CTTAGGTCAGATGGAGGTT	TTGGATAGAGGTGAAGAAGT

<i>BIK</i>	TATGGAGGACTTCGATTCTT	CTCAGTCTGGTCGTAGAT
<i>TNFAIP3</i>	CGTTCAGGACACAGACTT	TTCCAGTTCCGAGTATCATAG
<i>NR4A2</i>	AGGAGGAGATTGGACAGG	CACAAGGCATGGCTTCAG
<i>TFRC</i>	CAGAGCAGACATAAAGGAAAT	AAGTAGCACGGAAGAAGT
<i>EGR2</i>	GAGAAGAGGTCGTTGGAT	TGTAAGTGAAGGTCTGGTT
<i>SERPINB9</i>	CACCAGCAATGTATGAGAAT	AACACAATGAGATACCACTTC
<i>IFIH1</i>	TCTTGTCATAAAGGTACTGCTA	CCACTTAATCCAATAACACGATA
<i>ST6GAL1</i>	TATGGAGGACTTCGATTCTT	CTCAGTCTGGTCGTAGAT

4. Anticorps et analyse par cytométrie en flux

Pour les expériences d'immunofluorescence membranaire, 2.10^5 cellules sont incubées pendant 30 min à 4°C en présence d'anticorps ou d'un contrôle isotypique (IgG1). Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X, puis sont incubées pendant 20 min avec un anticorps secondaire. Après lavages, les cellules sont fixées dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) et analysées par un cytomètre FACSLSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les données recueillies sont traitées grâce au programme DIVA (BD Biosciences) et Flowjo. Pour les marquages intracellulaires, 5.10^5 cellules sont fixées dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), puis perméabilisées dans une solution de PBS 0,2% saponine, 0,5% BSA pendant 10 min. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min avec un anticorps primaire puis 20 min avec un anticorps secondaire. Après lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) et analysées par un cytomètre FACSLSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les données recueillies sont traitées grâce au programme DIVA (BD Biosciences) et Flowjo.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

Protéine	Clone/type d'anticorps	Fournisseur	Concentration
CD3	HIT3a	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
CD4	RPA-T4	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
CD8	RPA-T8	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
CD11c	BU15	Life technology	1/200 ^{ème}

CD27	M-T271	BD Pharmingen	1/200 ^{ème}
CD28	10F3	Caltag	1/200 ^{ème}
CD45RO	ALB11	immunotech	1/200 ^{ème}
CD45RA	UCHL1	DAKO	1/200 ^{ème}
CD62L	Dreg-56	Caltag	1/200 ^{ème}
CD69	TP1.55.3	immunotech	1/200 ^{ème}
CD83	HB15	miltenyi biotec	1/200 ^{ème}
CD103	LF61	Invitrogen	1/200 ^{ème}
CD107a	H3A4	BD Pharmingen	1/200 ^{ème}
CD127 (IL-7α)	RDR5	eBIOSCIENCE	1/200 ^{ème}
CD276 (PD-L1)	185504	R &D system	1/200 ^{ème}
CD279 (PD-1)	J105	eBIOSCIENCE	1/200 ^{ème}
CD326 (EpCAM)	9 E4	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
Bcl-2	MOPC-21	BD Pharmingen	1/50 ^{ème}
CCR5	HEK/1/85a	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
CCR6	53103	R&D SYSTEM	1/200 ^{ème}
CCR7	150503	R&D SYSTEM	1/200 ^{ème}
CTLA-4	14D3	eBIOSCIENCE	1/200 ^{ème}
E-cadherine	67A4	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
HLA-ABC	W6/32	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
KLRG1	2F1	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
IFN-γ	45-15	miltenyi biotec	1/50 ^{ème}
Gal-9	9M1.3	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
Gr-B	351927	R&D SYSTEM	1/50 ^{ème}
Tim-3	29F.1A12	BIOLEGENDE	1/200 ^{ème}
TNF-α	MAB11	BIOLEGENDE	1/50 ^{ème}

5. Test d'apoptose

L'AICD a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant un kit de détection d'apoptose à l'annexine-V (BD Pharmingen). Après la récupération de TIL et les cellules tumorales par tri des cellules au FACSARIAII basé sur la sélection de la taille, elles ont été soit maintenues dans du milieu ou stimulées pendant la nuit avec la r-IL-2 (5 U/ml) ou maintenues dans du

milieu seul, respectivement. Les TIL ont été pré-incubé pendant 1 h à 37 °C avec des Acm bloquants anti-PD-1, anti-Tim-3, une combinaison des deux Ac ou avec Ac contrôle isotypique IgG1. Ensuite, elles ont été mises en culture pendant 4 heures supplémentaires en présence de cellules tumorales autologues. Après 15 minutes d'incubation avec 5 µl de l'annexine-V de tampon de marquage et 5 µl d'iodure de propidium (PI), les cellules ont été analysées dans l'heure qui suit par cytométrie de flux au FACS LSR II. Pour la détection de l'apoptose des TIL, les cellules de CD8⁺/CD103⁺ ou CD8⁺/CD103⁻ ont été sélectionnées et ensuite analysées pour l'annexine-V et le PI.

6. Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des clones CTL est mesurée par le test conventionnel de relargage de chrome radioactif ⁵¹CrNa₂O₄ (Amersham-Biosciences). Après récupération des TIL (E) et des cellules tumorales (T) par tri cellulaire par FACS, les TIL ont été incubés dans un milieu stimulé pendant une nuit ou avec r-IL-2 (5U), et les cellules tumorales ont été maintenues dans du milieu seul. Brièvement, un million de cellules cibles (T) sont marquées avec 100 µCi de chrome radioactif pendant 1 h à 37°C. Après lavages, 3000 cellules sont déposées dans chaque puits de plaques 96 puits à fond rond. Les cellules tumorales autologues ont été utilisées en tant que cibles à un rapport E : T (10:1). Pour l'induction de la cytotoxicité, les TIL ou les cellules tumorales ont été pré-incubés pendant 1 h à 37 °C avec des Ac neutralisant anti-PD-1 ou anti-PD-L1, respectivement. IgG1 a été utilisé comme témoin. Après 4 h d'incubation, les surnageants sont transférés dans des plaques LumaPlate™ 96 puits (PerkinElmer), puis sont ensuite placées pendant 18 h à 46 °C. Leur lecture est faite à l'aide du programme TopCount NXT. Le pourcentage de lyse spécifique est alors calculé de manière conventionnelle.

7. Patients CBNPC pour l'étude clinique

Les échantillons de tumeurs primaires paraffinés ont été obtenus à partir de patients diagnostiqués avec un stade précoce CBNPC et qui ont subi une résection chirurgicale à l'Institut Mutualiste Montsouris (IMM) entre 1995 et 2002. Un total de 101 échantillons de tumeurs a été inclus dans cette étude et a été analysé. J'ai étudié l'expression de CD103, de CD8 et de CD3 sur les TIL, situés soit dans l'épithélium ou dans les régions du stroma, et pour leur association avec la survie des patients. La cohorte de patients est de stade pathologique 1 (33,7% étaient pT₁N₀ et 66,3% pT₂N₀) et aucun d'entre eux n'avait reçu un traitement néo-adjuvant au moment de la chirurgie. 44,5% étaient des adénocarcinomes (ADC), 42,6% des

carcinomes spinocellulaires (CSC), 12,9% ont été mélangés ou le carcinome à grandes cellules (LCC) et 3% d'autres types. L'âge au moment du diagnostic était 66,1 années (40,5 à 83,6); 68,3% des patients étaient des hommes; 89,1% étaient des utilisateurs de tabac, et la consommation moyenne de tabac était de 50 (5-100) paquets-années. Tous les patients ont signé un formulaire de consentement, en conformité avec la législation nationale et le comité d'éthique local.

8. Le marquage immunohistochimique

Des coupes en série des blocs de cancer du poumon en paraffine ont été marquées avec l'anti-CD3 (Thermofischer, France), l'anti-CD8 (Thermofischer, France), l'anti-CD103 mAb (Abcam) et ont été colorées avec l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Les coupes font 4 μm d'épaisseur et ont été montées sur lame de poly-lysine-L, déparaffinées et réhydratées par de l'éthanol. Le démasquage de l'antigène a été effectué dans un tampon citrate (pH = 6) pendant 30 min dans un bain-marie à 98 °c. L'activité de la peroxydase endogène a été inhibée avec 3% d'hydrogène peroxydase (Sigma-Aldrich) pendant 10 min et les protéines non spécifiques ont été bloquées pendant 15 minutes (BSA à 1% dans du PBS 1x). Les anticorps primaires ont été incubés pendant 1 h à température ambiante. Une immunocoloration a été visualisée grâce à une incubation avec un Ac de chèvre anti-lapin de la peroxydase de raifort (HRP) pendant 30 min à température ambiante, puis en ajoutant le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine) substrat (Powervision, Leica). Les lames ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer (VWR). Les contrôles négatifs ont été réalisés en remplaçant l'anticorps primaire avec un contrôle d'isotype d'IgG de lapin. Pour tous les marquages, les lames entières ont été numérisées en utilisant un scanner de lames (VS120, Olympus). Pour chaque lame, 3 zones de 0,88 mm² ont été sélectionnées par un pathologiste pour être représentatives de l'hétérogénéité potentielle de l'infiltration lymphocytaire dans la tumeur. La quantification du nombre de cellules CD3⁺, CD8⁺ et des cellules CD103⁺ a été réalisée manuellement dans chacune des zones sur des coupes en série des compartiments intra-épithéliales et stromales.

9. L'analyse statistique

La distribution des biomarqueurs CD103, CD8 et CD3 selon les facteurs cliniques (âge, type histologique, le statut tabagique de stade pathologique et le sexe) a été décrite pour chaque patient en fournissant les médianes et les intervalles. Les comparaisons de la distribution entre

les groupes ont été effectuées à l'aide de la loi Wilcoxon ou Kruskal Wallis. La DFS (*Disease-free survival*) a été définie par le délai entre le diagnostic de décès ou de rechute (locale ou distante), ou au dernier suivi (LFU). OS (*Overall survival*) a été défini comme le temps de diagnostic et le décès ou la date de LFU. Considérant CD103, CD8 et CD3 comme des variables continues, leur association avec DFS et OS a été évaluée à l'aide des modèles de Cox régression univariée et multivariée ajustement sur l'âge, le type histologique, le sexe, le stade et le tabagisme. Les hypothèses requises de proportionnalité dans l'analyse multivariée de survie ont été vérifiées graphiquement par le test de Schoenfeld. HR (*hazard ratio*) et leur IC (*confidence interval*) à 95% ont été fournis. Pour toutes les autres expériences, les données ont été comparées en utilisant le T-Test de Student à deux groupes. Deux groupes ont été considérés comme significativement différents si la P-value <0,05.

Projet 2 :

1. Les lignées de cellules de tumorales

La lignée de cellules LL2 a été dérivée d'une tumeur du poumon de souris (LLC: Lewis Lung Carcinoma). Elle a été découverte par le Dr Lewis (Wistar Institute) en 1951 et est apparue comme une tumeur pulmonaire spontanée chez la souris C57BL6. Elle est transplantée dans des souris C57BL/6 pour analyser la réponse immunitaire antitumorale maligne. Les cellules ont été maintenues en culture à 37 ° C (5% CO₂) dans le milieu DMEM-F12 avec 10% de FCS (Seromed ®, Berlin, Allemagne), 1% de pyruvate de sodium et 0,6% de pénicilline-streptomycine (Gibco , Invitrogen ®). Les cellules ont été transfectées avec un plasmide pPGK-E-hyg portant la E-cadhérine murine et/ou avec (CCL5) RANTES clonés dans un lentivirus (LV-RIG). Les cellules transfectées ont été cultivées dans le même milieu avec 50µg/ml de l'hygromycine B (Invitrogen) afin de sélectionner des cellules positives résistantes E-cadhérine⁺.

2. Souris sauvage et knock-out pour CD103

Les souris C57BL/6 (âgés de 6 semaines, sexe: femelle) ont été maintenues à l'animalerie de l'Institut Gustave Roussy et conservées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes à

travers les expériences. Les souris C57BL/6 déficientes pour le gène ITGAE (CD103) ont été achetées chez Jackson Laboratory (Etat-Unis). Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux règles des 3R (réduire, raffiner, remplacer)

3. Transfection de la lignée cellulaire LL2

Les cellules tumorales sont cultivées, en milieu de culture ne contenant pas d'antibiotiques, en plaque 6 puits jusqu'à atteindre 90% de confluence. Le jour de la transfection, 4 µg d'ADN plasmidique pPGK-E-hyg dilués en OPTIMEM-I (Gibco, Invitrogen), sont complexés avec la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) pendant 20 min à température ambiante. Puis le mélange est déposé sur les cellules tumorales qui seront incubées à 37°C pendant 4 h. Du milieu de culture sans antibiotique est ensuite ajouté. Après 48 h, les cellules tumorales sont mises dans un milieu frais contenant l'agent de sélection l'hygromycine B (Invitrogen) à la concentration de 50µg/ml. Les cellules transfectées sélectionnées sont ensuite analysées par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-E-cadhérine. Les cellules positives ont ensuite été triées par un FACSARIAII®. Ensuite, Les LL2 et LL2-E (E-cadherine+) ont été infectées par un lentivirus (LV-RIG) codant pour Rantes (CCL5) murin et GFP (Green Fluorescent Protein) comme décrit précédemment (Franciszkiewicz et al., 2009). Les cellules positives sont triées par un FACSVantage® sur la base de GFP.

4. Anticorps et cytométrie en flux

Pour les expériences d'immunofluorescence membranaire, 2.10^5 cellules sont incubées pendant 30 min à 4°C en présence d'anticorps ou d'un contrôle isotypique (IgG1). Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X, puis sont incubées pendant 20 min avec un anticorps secondaire. Après lavages, les cellules sont fixées dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) et analysées par un cytomètre FACSLSR II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les données recueillies sont traitées grâce au programme DIVA (BD Biosciences) et Flowjo. Pour les marquages intracellulaires, 5.10^5 cellules sont fixées dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), puis perméabilisées dans une solution de PBS 0,2% saponine, 0,5% BSA pendant 10 min. Les cellules sont ensuite incubées pendant 45 min avec un anticorps primaire puis 20 min avec un anticorps secondaire. Après lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X contenant 4% de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) et

analysées par un cytométrie FACSLSRII (Becton Dickinson, san Jose, CA). Les données recueillies sont traitées grâce au programme DIVA (BD Biosciences) et Flowjo.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

Protéine	Clone/type d'anticorps	Fournisseur	Concentration
CD3	145-2C11	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
CD4	RM4-5	Invitrogen	1/100 ^{ème}
CD8	5H10	Caltag	1/100 ^{ème}
CD103	2 E7	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
CD69	H1.2F3	Caltag	1/100 ^{ème}
CD62L	MEL-14	Invitrogen	1/100 ^{ème}
CD25	3C7	BD Pharmingen	1/100 ^{ème}
CD28	37.51	eBIOSCIENCE	1/100 ^{ème}
PD-1	29F.1A12	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
Tim-3	B8.2C12	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
Gal-9	R69-35	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
CCL5	VL1	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
CD27	LG3A10	BIOLEGENDE	1/100 ^{ème}
E-cadherine	ECCD-2	Invitrogen	1/100 ^{ème}
H-2b	ND	Caltag	1/100 ^{ème}

5. Test de prolifération

5x10⁴ cellules LL2 ont étéensemencées dans une plaque à 96 puits pendant une nuit (O/N). Après incubation ON, le milieu contenant de la thymidine tritié (H₃; 1µCi/ml) a été ajouté et les cellules ont été cultivées pendant 12 h supplémentaires. Les cellules ont ensuite été récoltées en utilisant la ramasseuse-dispositif (Perkin-Elmer) et les filtres ont été séchés à

45°C pendant 4 h. Le liquide de scintillation (Microscint cocktail) a été ajouté dans chaque puits. L'ADN radiomarké a été quantifiée par un compteur d'émission de rayons β (TopCount NXT β -compteur empileur). Les valeurs sont exprimées en cpm (coup par minute) et représentent la moyenne de trois exemplaires. La déviation standard n'a jamais dépassé de plus de 9% la moyenne.

6. Progression tumorale in vivo

Les femelles C57BL/6 de 6 à 8 semaines ont été anesthésiées et identifiées par un badge à l'oreille. 3×10^5 cellules LL2 (LL2, LL2-R, LL2-E et LL2-ER) ont été mises en suspension dans 100 ml de PBS 1X et 1% de FCS et ont été transplantées dans le bas du dos de la souris par injection sous-cutanée. Les tumeurs ont commencé à être palpables 8 à 12 jours après la transplantation et ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse toute les 48 h (Electronic Digital Caliper, Chine). La moyenne du volume des tumeurs a été calculée et tracées en mm^2 . Les animaux ont été sacrifiés 22-25 jours post-transplantation. Les tumeurs ont été enlevées, pesés et photographiées.

7. Purification des TIL

Des souris âgées de 8 à 12 semaines ($n = 5-10$ par groupe) ont été inoculées avec 3×10^5 de cellules (LL2, LL2-R, LL2-E et LL2-ER). Les souris ont été sacrifiées à J-15, et les tumeurs ont été récupérées dans des tubes Falcon de 10 ml contenant du milieu RPMI 1640 sans sérum (avec un antibiotique et pyruvate de sodium) et ensuite leur poids a été mesuré. Elles ont été dissociées mécaniquement et enzymatiquement. Ensuite, les cellules résultantes ont été lavées, et les globules rouges ont été lysés par addition de 5 ml d'ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) pendant 3 min, suivie par un lavage dans 10 ml de RPMI 1640. Les cellules obtenues ont ensuite filtré à travers une membrane de cellulose et mises en suspension à raison de 10^7 cellules/ml. Ensuite, les lymphocytes T ont été ensuite sélectionnés positivement en utilisant des anticorps Dynabeads anti-CD90.2 revêtues de mAb selon le protocole d'immunosélection standard recommandé par le fabricant (Dyna, Invitrogen). Les suspensions cellulaires ont été marquées avec mAb anti-CD3. Jusqu'à 85% des cellules CD3^+ ont été purifiées. Les TIL isolés ont été directement utilisés pour des analyses fonctionnelles et phénotypiques. Pour évaluer le nombre de TIL $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$ et $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ par gramme de tumeur, le pourcentage du sous-ensemble respectif a été multiplié par le nombre total de cellules CD3^+ et divisé par 100. Le nombre obtenu a été divisée par la masse (en grammes) des 5-10 tumeurs réséquées.

8. Technologie des puces à ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir des TIL de souris, triés avec l'anticorps anti-CD90.2, grâce à l'utilisation du TRIzol (Sigma-Aldrich). Ensuite, la qualité des ARN est contrôlée par bio-analyseur. Une fois les ARN validés, ils sont utilisés sur des puces à ARN (Agilent). La synthèse des sondes et l'étiquetage ont été effectués grâce à un kit à faible amplification de la fluorescence (Agilent). L'hybridation a été effectuée sur l'ensemble du génome humain avec une puce « SurePrint G3 GE 8x60K » (AMADID 28004) en utilisant les réactifs et les protocoles fournis par le fabricant. Le logiciel d'extraction de données, fourni par Agilent (version 10.7.3.1), a été utilisé pour quantifier l'intensité de la fluorescence de l'image. Les données ont été normalisées par une méthode quantile « limma Bioconductor R ». L'analyse différentielle de l'expression des gènes a été effectuée avec le test T de « LIMMA modéré ».

REFERENCES

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-793.
- Abrams, S. I., S. F. Stanziale, et al. (1996). "Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4+ and CD8+ T cell responses." Eur J Immunol **26**(2): 435-443.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-949.
- Adair, B. D. and M. Yeager (2002). "Three-dimensional model of the human platelet integrin alpha IIb beta 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14059-14064.
- Ademmer, K., M. Ebert, et al. (1998). "Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+CD18+ cells and CD8+CD103+ cells by multi-epitope imaging." Clin Exp Immunol **112**(1): 21-26.
- Afonina, I. S., S. P. Cullen, et al. (2010). "Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B." Immunol Rev **235**(1): 105-116.
- Agace, W. W., J. M. Higgins, et al. (2000). "T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines." Curr Opin Cell Biol **12**(5): 563-568.
- Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science **272**(5258): 54-60.
- Aisner, D. L. and C. B. Marshall (2012). "Molecular pathology of non-small cell lung cancer: a practical guide." Am J Clin Pathol **138**(3): 332-346.
- Akbay, E. A., S. Koyama, et al. (2013). "Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors." Cancer Discov **3**(12): 1355-1363.
- Al-Hamidi, A., M. Pekalski, et al. (2008). "Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of alphaE(CD103)beta7 integrin-expressing intratubular T cells." Mol Immunol **45**(15): 4000-4007.
- Algarra, I., T. Cabrera, et al. (2000). "The HLA crossroad in tumor immunology." Hum Immunol **61**(1): 65-73.
- Allenspach EJ, C. P., Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, Cannon JL, Takahashi SM, Morgan R, Burkhardt JK, Sperling AI (2001). "ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse." Immunity **15**: 739-750.
- Almand, B., J. I. Clark, et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." J Immunol **166**(1): 678-689.
- Almand, B., J. R. Resser, et al. (2000). "Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer." Clin Cancer Res **6**(5): 1755-1766.
- Anderson, A. C. (2012). "Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity." Curr Opin Immunol **24**(2): 213-216.
- Anderson, A. C., D. E. Anderson, et al. (2007). "Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells." Science **318**(5853): 1141-1143.
- Andrin, C., M. J. Pinkoski, et al. (1998). "Interaction between a Ca2+-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules." Biochemistry **37**(29): 10386-10394.
- Anikeeva, N., K. Somersalo, et al. (2005). "Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6437-6442.
- Anita Chhabra, P. A. a. M. K. (2013). "Gut CD103+ dendritic cells from female lupus-prone (NZBxNZW) F1 (BWF1) mice are much less effective than male BWF1 mice at inducing iTregs (P4087)." The Journal of Immunology **190**, 127.15.
- Annacker, O., J. L. Coombes, et al. (2005). "Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis." J Exp Med **202**(8): 1051-1061.

- Anz, D., W. Mueller, et al. (2011). "CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells." Int J Cancer **129**(10): 2417-2426.
- Aramaki, O., N. Shirasugi, et al. (2004). "Programmed death-1-programmed death-L1 interaction is essential for induction of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigen." Transplantation **77**(1): 6-12.
- Arens, R. and S. P. Schoenberger (2010). "Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation." Immunol Rev **235**(1): 190-205.
- Arpinati, M., G. Chirumbolo, et al. (2003). "Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Transpl Immunol **11**(3-4): 345-356.
- Asakura, H., Y. Kashio, et al. (2002). "Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9." J Immunol **169**(10): 5912-5918.
- Asperti-Boursin, F., E. Real, et al. (2007). "CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner." J Exp Med **204**(5): 1167-1179.
- Athie-Morales, V., H. H. Smits, et al. (2004). "Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development." J Immunol **172**(1): 61-69.
- Ayyoub, M., P. Pignon, et al. (2013). "CD4+ T effectors specific for the tumor antigen NY-ESO-1 are highly enriched at ovarian cancer sites and coexist with, but are distinct from, tumor-associated Treg." Cancer Immunol Res **1**(5): 303-308.
- Bachmann, M. F., P. Wolint, et al. (2005). "Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L." J Immunol **175**(7): 4686-4696.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-1253.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2003). "CD4+CD25⁺ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo." Novartis Found Symp **252**: 67-88; discussion 88-91, 106-114.
- Baitsch, L., P. Baumgaertner, et al. (2011). "Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients." J Clin Invest **121**(6): 2350-2360.
- Banchereau, J., S. Paczesny, et al. (2003). "Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy." Ann N Y Acad Sci **987**: 180-187.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2006). "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection." Nature **439**(7077): 682-687.
- Barczyk, M., S. Carracedo, et al. (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.
- Baron, J. L., J. A. Madri, et al. (1993). "Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma." J Exp Med **177**(1): 57-68.
- Bates, G. J., S. B. Fox, et al. (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." J Clin Oncol **24**(34): 5373-5380.
- Beal, A. M., N. Anikeeva, et al. (2009). "Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain." Immunity **31**(4): 632-642.
- Belldegrun, A., L. M. Muul, et al. (1988). "Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity." Cancer Res **48**(1): 206-214.
- Berger, R., R. Rotem-Yehudar, et al. (2008). "Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies." Clin Cancer Res **14**(10): 3044-3051.
- Berke, G. (1995). "The CTL's kiss of death." Cell **81**(1): 9-12.
- Berthon, C., V. Driss, et al. (2010). "In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors." Cancer Immunol Immunother **59**(12): 1839-1849.

- Berzofsky, J. A. and M. Terabe (2008). "NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis." *J Immunol* **180**(6): 3627-3635.
- Besser, M. J., R. Shapira-Frommer, et al. (2013). "Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies." *Clin Cancer Res* **19**(17): 4792-4800.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bevan, M. J. (2011). "Memory T cells as an occupying force." *Eur J Immunol* **41**(5): 1192-1195.
- Bingle, L., N. J. Brown, et al. (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." *J Pathol* **196**(3): 254-265.
- Blackburn, S. D., H. Shin, et al. (2008). "Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 15016-15021.
- Bladergroen, B. A., C. J. Meijer, et al. (2002). "Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system?" *Blood* **99**(1): 232-237.
- Blank, C., I. Brown, et al. (2003). "Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells." *J Immunol* **171**(9): 4574-4581.
- Blattman, J. N., R. Antia, et al. (2002). "Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells." *J Exp Med* **195**(5): 657-664.
- Blott, E. J. and G. M. Griffiths (2002). "Secretory lysosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(2): 122-131.
- Bogunovic, M., F. Ginhoux, et al. (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." *Immunity* **31**(3): 513-525.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, et al. (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." *Cell* **85**(6): 803-815.
- Bossi, G., C. Trambas, et al. (2002). "The secretory synapse: the secrets of a serial killer." *Immunol Rev* **189**: 152-160.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, et al. (1993). "B7 but not intercellular adhesion molecule-1 costimulation prevents the induction of human alloantigen-specific tolerance." *J Exp Med* **178**(5): 1753-1763.
- Bousso, P. and E. Robey (2003). "Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes." *Nat Immunol* **4**(6): 579-585.
- Brahmer, J. R., C. G. Drake, et al. (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates." *J Clin Oncol* **28**(19): 3167-3175.
- Brahmer, J. R., S. S. Tykodi, et al. (2012). "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer." *N Engl J Med* **366**(26): 2455-2465.
- Brandwijk, R. J., R. P. Dings, et al. (2006). "Anti-angiogenesis and anti-tumor activity of recombinant anginex." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(3): 1073-1078.
- Breart, B., F. Lemaitre, et al. (2008). "Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice." *J Clin Invest* **118**(4): 1390-1397.
- Brenner, D. R., P. Boffetta, et al. (2012). "Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium." *Am J Epidemiol* **176**(7): 573-585.
- Brenner, D. R., J. R. McLaughlin, et al. (2011). "Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis." *PLoS One* **6**(3): e17479.
- Bronte, V., D. B. Chappell, et al. (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* **162**(10): 5728-5737.
- Brown, C. E., R. P. Vishwanath, et al. (2007). "Tumor-derived chemokine MCP-1/CCL2 is sufficient for mediating tumor tropism of adoptively transferred T cells." *J Immunol* **179**(5): 3332-3341.

- Brown, D. W., J. Furness, et al. (1999). "Mechanisms of binding of cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive and alpha-beta7-positive lymphocytes to oral and skin keratinocytes." Immunology **98**(1): 9-15.
- Brown, T., A. Darnton, et al. (2012). "Occupational cancer in Britain. Respiratory cancer sites: larynx, lung and mesothelioma." Br J Cancer **107** Suppl 1: S56-70.
- Bruckener, K. E., A. el Baya, et al. (2003). "Permeabilization in a cerebral endothelial barrier model by pertussis toxin involves the PKC effector pathway and is abolished by elevated levels of cAMP." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1837-1846.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Burnet, F. M. (1971). "Immunological surveillance in neoplasia." Transplant Rev **7**: 3-25.
- Burnet, M. (1957). "Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications." Br Med J **1**(5023): 841-847.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-786.
- Bussemakers, M. J. and J. A. Schalken (1996). "The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis." World J Urol **14**(3): 151-156.
- Butte, M. J., M. E. Keir, et al. (2007). "Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses." Immunity **27**(1): 111-122.
- Butz, E. A. and M. J. Bevan (1998). "Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection." Immunity **8**(2): 167-175.
- Calderwood, D. A., Y. Fujioka, et al. (2003). "Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2272-2277.
- Campoli, M. and S. Ferrone (2008). "HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance." Oncogene **27**(45): 5869-5885.
- Cao, E., X. Zang, et al. (2007). "T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface." Immunity **26**(3): 311-321.
- Cao, X., S. F. Cai, et al. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-646.
- Carter, L. L., M. W. Leach, et al. (2007). "PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **182**(1-2): 124-134.
- Cassan, C., E. Piaggio, et al. (2006). "Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **177**(3): 1552-1560.
- Cauley, L. S. and L. Lefrancois (2013). "Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells." Mucosal Immunol **6**(1): 14-23.
- Ceeraz, S., E. C. Nowak, et al. (2013). "B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease." Trends Immunol **34**(11): 556-563.
- Cepek, K. L., C. M. Parker, et al. (1993). "Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells." J Immunol **150**(8 Pt 1): 3459-3470.
- Cepek, K. L., S. K. Shaw, et al. (1994). "Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin." Nature **372**(6502): 190-193.
- Cerf-Bensussan, N., A. Jarry, et al. (1987). "A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes." Eur J Immunol **17**(9): 1279-1285.
- Chabot, S., Y. Kashio, et al. (2002). "Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells." Glycobiology **12**(2): 111-118.
- Chambers, C. A., T. J. Sullivan, et al. (1997). "Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells." Immunity **7**(6): 885-895.
- Champiat, S., E. Ileana, et al. (2014). "Incorporating immune-checkpoint inhibitors into systemic therapy of NSCLC." J Thorac Oncol **9**(2): 144-153.

- Chang, C. C., M. Campoli, et al. (2005). "Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK Cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions." Adv Cancer Res **93**: 189-234.
- Chaput, N., G. Darrasse-Jeze, et al. (2007). "Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites." J Immunol **179**(8): 4969-4978.
- Chen, C., Q. X. Qu, et al. (2012). "Induced expression of B7-H4 on the surface of lung cancer cell by the tumor-associated macrophages: a potential mechanism of immune escape." Cancer Lett **317**(1): 99-105.
- Chen, L., V. Pai, et al. (2009). "Constitutive neuronal expression of the immune regulator, programmed death 1 (PD-1), identified during experimental autoimmune uveitis." Ocul Immunol Inflamm **17**(1): 47-55.
- Chen, W., M. E. Frank, et al. (2001). "TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu." Immunity **14**(6): 715-725.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chen, X., S. Liu, et al. (2008). "Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia." Cancer Biol Ther **7**(5): 622-627.
- Chen, X., R. T. Winkler-Pickett, et al. (2006). "Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells." Eur J Immunol **36**(3): 671-680.
- Chen, Z. M., M. J. O'Shaughnessy, et al. (2003). "IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function." Blood **101**(12): 5076-5083.
- Cheng, L., J. Jiang, et al. (2009). "B7-H4 expression promotes tumorigenesis in ovarian cancer." Int J Gynecol Cancer **19**(9): 1481-1486.
- Chinnaiyan, A. M. and V. M. Dixit (1997). "Portrait of an executioner: the molecular mechanism of FAS/APO-1-induced apoptosis." Semin Immunol **9**(1): 69-76.
- Chou, F. C., S. J. Shieh, et al. (2009). "Attenuation of Th1 response through galectin-9 and T-cell Ig mucin 3 interaction inhibits autoimmune diabetes in NOD mice." Eur J Immunol **39**(9): 2403-2411.
- Chow, K. M. and A. B. Rabie (2000). "Vascular endothelial growth pattern of endochondral bone graft in the presence of demineralized intramembranous bone matrix--quantitative analysis." Cleft Palate Craniofac J **37**(4): 385-394.
- Chowdhury, D. and J. Lieberman (2008). "Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death." Annu Rev Immunol **26**: 389-420.
- Christiansson, L., S. Soderlund, et al. (2013). "Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia." PLoS One **8**(1): e55818.
- Christmas, S. E., R. Brew, et al. (1993). "T-cell receptor heterogeneity of gamma delta T-cell clones from human female reproductive tissues." Immunology **78**(3): 436-443.
- Clark, W. H. (1991). "Tumour progression and the nature of cancer." Br J Cancer **64**(4): 631-644.
- Clemente, C. G., M. C. Mihm, Jr., et al. (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." Cancer **77**(7): 1303-1310.
- Cluff, C. W. (2009). "Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results." Adv Exp Med Biol **667**: 111-123.
- Clynes, R. A., T. L. Towers, et al. (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med **6**(4): 443-446.
- Cobbs, C. S., T. R. Whisenhunt, et al. (2003). "Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells." Cancer Res **63**(24): 8670-8673.
- Cogliano, V. J., R. Baan, et al. (2011). "Preventable exposures associated with human cancers." J Natl Cancer Inst **103**(24): 1827-1839.

- Cohen, M. H. and M. J. Matthews (1978). "Small cell bronchogenic carcinoma: a distinct clinicopathologic entity." *Semin Oncol* **5**(3): 234-243.
- Collins, A. V., D. W. Brodie, et al. (2002). "The interaction properties of costimulatory molecules revisited." *Immunity* **17**(2): 201-210.
- Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." *J Exp Med* **204**(8): 1757-1764.
- Corps, E., C. Carter, et al. (2001). "Recognition of E-cadherin by integrin alpha(E)beta(7): requirement for cadherin dimerization and implications for cadherin and integrin function." *J Biol Chem* **276**(33): 30862-30870.
- Cote, M. L., M. Liu, et al. (2012). "Increased risk of lung cancer in individuals with a family history of the disease: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium." *Eur J Cancer* **48**(13): 1957-1968.
- Coughlin, C. M., K. E. Salhany, et al. (1998). "Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." *Immunity* **9**(1): 25-34.
- Cresswell, J., W. K. Wong, et al. (2002). "Adhesion of lymphocytes to bladder cancer cells: the role of the alpha(E)beta(7) integrin." *Cancer Immunol Immunother* **51**(9): 483-491.
- Cullen, S. P., M. Brunet, et al. (2010). "Granzymes in cancer and immunity." *Cell Death Differ* **17**(4): 616-623.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-949.
- Cyster, J. G. (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." *Annu Rev Immunol* **23**: 127-159.
- Cyster, J. G. and S. R. Schwab (2012). "Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs." *Annu Rev Immunol* **30**: 69-94.
- Danguy, A., I. Camby, et al. (2002). "Galectins and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3): 285-293.
- Dardalhon, V., A. C. Anderson, et al. (2010). "Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells." *J Immunol* **185**(3): 1383-1392.
- Das V, N. B., Roumier A, Meas-Yedid V, Zimmer C, Olivo-Marin JC, Roux P, Ferrier P, Dautry-Varsat A, Alcover A (2002). "Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation." *Immunological reviews* **189**: 123-135.
- de Vries, I. J., E. G. Langeveld-Wildschut, et al. (1997). "Nonspecific T-cell homing during inflammation in atopic dermatitis: expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen and integrin alphaE beta7 on skin-infiltrating T cells." *J Allergy Clin Immunol* **100**(5): 694-701.
- Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." *Oncogene* **23**(16): 2950-2966.
- del Rio, M. L., G. Bernhardt, et al. (2010). "Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells." *Immunol Rev* **234**(1): 268-281.
- Delon J, K. K., Germain RN (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." *Immunity* **15**: 691-701.
- Di Giacomo, A. M., L. Calabro, et al. (2013). "Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme." *Cancer Immunol Immunother* **62**(6): 1021-1028.
- Dietz, S. B., D. Whitaker-Menezes, et al. (1996). "The role of alpha E beta 7 integrin (CD103) and E-cadherin in epidermotropism in cutaneous T-cell lymphoma." *J Cutan Pathol* **23**(4): 312-318.
- Dighe, A. S., E. Richards, et al. (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." *Immunity* **1**(6): 447-456.
- Ding, H., X. Wu, et al. (2006). "Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice." *Clin Immunol* **118**(2-3): 258-267.

- Disis, M. L., E. Calenoff, et al. (1994). "Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer." *Cancer Res* **54**(1): 16-20.
- DiSpirito, J. R. and H. Shen (2010). "Quick to remember, slow to forget: rapid recall responses of memory CD8+ T cells." *Cell Res* **20**(1): 13-23.
- Do, B., I. S. Lossos, et al. (2003). "Analysis of FAS (CD95) gene mutations in higher-grade transformation of follicle center lymphoma." *Leuk Lymphoma* **44**(8): 1317-1323.
- Dong, H. and L. Chen (2003). "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity." *J Mol Med (Berl)* **81**(5): 281-287.
- Dong, H., S. E. Strome, et al. (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nat Med* **8**(8): 793-800.
- Dong, H., G. Zhu, et al. (1999). "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion." *Nat Med* **5**(12): 1365-1369.
- Dong, H., G. Zhu, et al. (2004). "B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes." *Immunity* **20**(3): 327-336.
- Drake, C. G. (2012). "Combination immunotherapy approaches." *Ann Oncol* **23** Suppl 8: viii41-46.
- Druey, K. M., K. J. Blumer, et al. (1996). "Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family." *Nature* **379**(6567): 742-746.
- Dudley, M. E., C. A. Gross, et al. (2013). "Randomized selection design trial evaluating CD8+-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma." *J Clin Oncol* **31**(17): 2152-2159.
- Dudley, M. E. and S. A. Rosenberg (2003). "Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(9): 666-675.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al. (2002). "A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma." *J Immunother* **25**(3): 243-251.
- Duncan, D. D. and S. L. Swain (1994). "Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages." *Eur J Immunol* **24**(10): 2506-2514.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* **22**: 329-360.
- Dupuis, M., E. Schaerer, et al. (1993). "The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* **177**(1): 1-7.
- Dustin, M. L. a. D. R. C. (2002). "Neural and immunological synaptic relations." *Science* **298**(5594): 785-9.
- Echchakir, H., C. Asselin-Paturel, et al. (1999). "Analysis of T-cell-receptor beta-chain-gene usage in peripheral-blood and tumor-infiltrating lymphocytes from human non-small-cell lung carcinomas." *Int J Cancer* **81**(2): 205-213.
- Echchakir, H., I. Vergnon, et al. (2000). "Evidence for in situ expansion of diverse antitumor-specific cytotoxic T lymphocyte clones in a human large cell carcinoma of the lung." *Int Immunol* **12**(4): 537-546.
- El-Asady, R., R. Yuan, et al. (2005). "TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease." *J Exp Med* **201**(10): 1647-1657.
- El-Hariry, I., M. Jordinson, et al. (1999). "Characterization of the E-cadherin-catenin complexes in pancreatic carcinoma cell lines." *J Pathol* **188**(2): 155-162.
- El Hage, F., S. Abouzahr-Rifai, et al. (2008). "[Immune response and cancer]." *Bull Cancer* **95**(1): 57-67.
- Elgert, K. D., D. G. Alleva, et al. (1998). "Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection." *J Leukoc Biol* **64**(3): 275-290.

- Ericsson, A., M. Svensson, et al. (2004). "CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes." *Eur J Immunol* **34**(10): 2720-2729.
- Erle, D. J., T. Brown, et al. (1994). "Lung epithelial lining fluid T cell subsets defined by distinct patterns of beta 7 and beta 1 integrin expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**(3): 237-244.
- Erren, T. C., P. Morfeld, et al. (2011). "Meta-analyses of published epidemiological studies, 1979-2006, point to open causal questions in silica-silicosis-lung cancer research." *Med Lav* **102**(4): 321-335.
- Esteller, M. (2006). "Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes." *Br J Cancer* **94**(2): 179-183.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(12): 1206-1212.
- Fan, X. H., B. H. Han, et al. (2003). "[Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cells from patients with non-small cell lung carcinoma]." *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* **26**(9): 539-543.
- Fanning, A., Y. Volkov, et al. (2005). "CD44 cross-linking induces protein kinase C-regulated migration of human T lymphocytes." *Int Immunol* **17**(4): 449-458.
- Fantini, M. C., C. Becker, et al. (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." *J Immunol* **172**(9): 5149-5153.
- Faroudi, M., C. Utzny, et al. (2003). "Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14145-14150.
- Feng, Y., D. Wang, et al. (2002). "CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8(+) T cells." *J Exp Med* **196**(7): 877-886.
- Ferrini, S., R. Biassoni, et al. (1985). "Clonal analysis of T lymphocytes isolated from ovarian carcinoma ascitic fluid. Phenotypic and functional characterization of T-cell clones capable of lysing autologous carcinoma cells." *Int J Cancer* **36**(3): 337-343.
- Ferrone, S. and F. M. Marincola (1995). "Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance." *Immunol Today* **16**(10): 487-494.
- Fick, J., F. G. Barker, 2nd, et al. (1995). "The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11071-11075.
- Fife, B. T. and J. A. Bluestone (2008). "Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways." *Immunol Rev* **224**: 166-182.
- Fife, B. T., I. Guleria, et al. (2006). "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway." *J Exp Med* **203**(12): 2737-2747.
- Fife, B. T. and K. E. Pauken (2011). "The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance." *Ann N Y Acad Sci* **1217**: 45-59.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.
- Fourcade, J., Z. Sun, et al. (2010). "Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients." *J Exp Med* **207**(10): 2175-2186.
- Francisco, L. M., V. H. Salinas, et al. (2009). "PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells." *J Exp Med* **206**(13): 3015-3029.
- Franciszkievicz, K., A. Le Floch, et al. (2013). "CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions." *Cancer Res* **73**(2): 617-628.
- Franciszkievicz, K., A. Le Floch, et al. (2009). "Intratumoral induction of CD103 triggers tumor-specific CTL function and CCR5-dependent T-cell retention." *Cancer Res* **69**(15): 6249-6255.

- Fransen, L., J. Van der Heyden, et al. (1986). "Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines." Eur J Cancer Clin Oncol **22**(4): 419-426.
- Fraser, S. A., R. Karimi, et al. (2000). "Perforin lytic activity is controlled by calreticulin." J Immunol **164**(8): 4150-4155.
- Fraser, S. A., M. Michalak, et al. (1998). "Calreticulin, a component of the endoplasmic reticulum and of cytotoxic lymphocyte granules, regulates perforin-mediated lysis in the hemolytic model system." Biochem Cell Biol **76**(5): 881-887.
- Freeman, G. J., J. M. Casasnovas, et al. (2010). "TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity." Immunol Rev **235**(1): 172-189.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.
- Freeman, G. J., E. J. Wherry, et al. (2006). "Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade." J Exp Med **203**(10): 2223-2227.
- Freiberg, B. A., H. Kupfer, et al. (2002). "Staging and resetting T cell activation in SMACs." Nat Immunol **3**(10): 911-917.
- French, J. J., J. Cresswell, et al. (2002). "T cell adhesion and cytolysis of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy?" Br J Cancer **87**(9): 1034-1041.
- Frixen, U. H., J. Behrens, et al. (1991). "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." J Cell Biol **113**(1): 173-185.
- Frost, G., A. Darnton, et al. (2011). "The effect of smoking on the risk of lung cancer mortality for asbestos workers in Great Britain (1971-2005)." Ann Occup Hyg **55**(3): 239-247.
- Fujimoto, K., T. Karuppuhachamy, et al. (2011). "A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity." J Immunol **186**(11): 6287-6295.
- Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." Nat Rev Immunol **4**(12): 941-952.
- Gabrilovich, D. I., V. Bronte, et al. (2007). "The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **67**(1): 425; author reply 426.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-174.
- Gabrilovich, D. I. a. S. N. (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-74.
- Galon, J., F. Pages, et al. (2012). "Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force." J Transl Med **10**: 205.
- Garcia-Lora, A., I. Algarra, et al. (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." J Cell Physiol **195**(3): 346-355.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-2065.
- Garrido, F., T. Cabrera, et al. (1993). "Natural history of HLA expression during tumour development." Immunol Today **14**(10): 491-499.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, et al. (1997). "Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours." Immunol Today **18**(2): 89-95.
- Gastl, G. A., J. S. Abrams, et al. (1993). "Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression." Int J Cancer **55**(1): 96-101.
- Gati, A., N. Guerra, et al. (2003). "CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling." Cancer Res **63**(21): 7475-7482.
- Gati, A., N. Guerra, et al. (2001). "Tumor cells regulate the lytic activity of tumor-specific cytotoxic t lymphocytes by modulating the inhibitory natural killer receptor function." Cancer Res **61**(8): 3240-3244.

- Gebhardt, T. and F. R. Carbone (2009). "Immunology: A helpers' guide to infection." Nature **462**(7272): 418-419.
- Gebhardt, T., S. N. Mueller, et al. (2013). "Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells." Trends Immunol **34**(1): 27-32.
- Gebhardt, T., L. M. Wakim, et al. (2009). "Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus." Nat Immunol **10**(5): 524-530.
- Geiger, B. and O. Ayalon (1992). "Cadherins." Annu Rev Cell Biol **8**: 307-332.
- Geissmann, F., P. Revy, et al. (1999). "TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells." J Immunol **162**(8): 4567-4575.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, et al. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-333.
- Geserick, P., C. Drewniok, et al. (2008). "Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis." Oncogene **27**(22): 3211-3220.
- Gladwish, A., K. Clarke, et al. (2010). "Spontaneous regression in advanced non-small cell lung cancer." BMJ Case Rep **2010**.
- Glinskii, O. V., S. Sud, et al. (2012). "Inhibition of prostate cancer bone metastasis by synthetic TF antigen mimic/galectin-3 inhibitor lactulose-L-leucine." Neoplasia **14**(1): 65-73.
- Gorfu, G., J. Rivera-Nieves, et al. (2009). "Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention." Curr Mol Med **9**(7): 836-850.
- Gorski, D. H., A. D. Leal, et al. (2003). "Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms at different stages of melanoma progression." J Am Coll Surg **197**(3): 408-418.
- Goswami, S., E. Sahai, et al. (2005). "Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop." Cancer Res **65**(12): 5278-5283.
- Gough, M., M. Crittenden, et al. (2005). "Gene therapy to manipulate effector T cell trafficking to tumors for immunotherapy." J Immunol **174**(9): 5766-5773.
- Govindan, R., N. Page, et al. (2006). "Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database." J Clin Oncol **24**(28): 4539-4544.
- Green, K. A., W. J. Cook, et al. (2013). "Myeloid-derived suppressor cells in murine retrovirus-induced AIDS inhibit T- and B-cell responses in vitro that are used to define the immunodeficiency." J Virol **87**(4): 2058-2071.
- Greenberg, P. D. (1991). "Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells." Adv Immunol **49**: 281-355.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-548.
- Griffith, T. S., W. A. Chin, et al. (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." J Immunol **161**(6): 2833-2840.
- Groh, V., J. Wu, et al. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-738.
- Gronbaek, K., P. T. Straten, et al. (1998). "Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity." Blood **92**(9): 3018-3024.
- Gros, A., P. F. Robbins, et al. (2014). "PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors." J Clin Invest **124**(5): 2246-2259.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-2848.
- Grulich, A. E., M. T. van Leeuwen, et al. (2007). "Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis." Lancet **370**(9581): 59-67.
- Grunwald, G. B. (1993). "The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules." Curr Opin Cell Biol **5**(5): 797-805.

- Guerra, N., M. Guillard, et al. (2000). "Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas." *Blood* **95**(9): 2883-2889.
- Guilloux, Y., C. Viret, et al. (1994). "Defective lymphokine production by most CD8+ and CD4+ tumor-specific T cell clones derived from human melanoma-infiltrating lymphocytes in response to autologous tumor cells in vitro." *Eur J Immunol* **24**(9): 1966-1973.
- Haanen, J. B., A. Baars, et al. (2006). "Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients." *Cancer Immunol Immunother* **55**(4): 451-458.
- Hadley, G. (2004). "Role of integrin CD103 in promoting destruction of renal allografts by CD8 T cells." *Am J Transplant* **4**(7): 1026-1032.
- Hadley, G. A., S. T. Bartlett, et al. (1997). "The epithelial cell-specific integrin, CD103 (alpha E integrin), defines a novel subset of alloreactive CD8+ CTL." *J Immunol* **159**(8): 3748-3756.
- Hadley, G. A., C. Charandee, et al. (2001). "CD103+ CTL accumulate within the graft epithelium during clinical renal allograft rejection." *Transplantation* **72**(9): 1548-1555.
- Hagemann, T., S. C. Robinson, et al. (2004). "Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases." *Carcinogenesis* **25**(8): 1543-1549.
- Hagemann, T., J. Wilson, et al. (2005). "Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK." *J Immunol* **175**(2): 1197-1205.
- Haile, S. T., J. J. Bosch, et al. (2011). "Tumor cell programmed death ligand 1-mediated T cell suppression is overcome by coexpression of CD80." *J Immunol* **186**(12): 6822-6829.
- Hallermalm, K., K. Seki, et al. (2008). "Modulation of the tumor cell phenotype by IFN-gamma results in resistance of uveal melanoma cells to granule-mediated lysis by cytotoxic lymphocytes." *J Immunol* **180**(6): 3766-3774.
- Hamai, A., F. Meslin, et al. (2008). "ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway." *Cancer Res* **68**(23): 9854-9864.
- Hao, C., F. Beguinot, et al. (2001). "Induction and intracellular regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediated apoptosis in human malignant glioma cells." *Cancer Res* **61**(3): 1162-1170.
- Hayashi, T., T. Hideshima, et al. (2003). "Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes." *Blood* **102**(4): 1435-1442.
- Henderson NC1, A. T., Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP, Lacy-Hulbert A, Adams RH, Sheppard D. (2013). "Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs." *Nat Med* **(12)**:1617-24.
- Higgins, J. M., M. Cernadas, et al. (2000). "The role of alpha and beta chains in ligand recognition by beta 7 integrins." *J Biol Chem* **275**(33): 25652-25664.
- Higgins, J. M., D. A. Mandlebrot, et al. (1998). "Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin." *J Cell Biol* **140**(1): 197-210.
- Hirano, F., K. Kaneko, et al. (2005). "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity." *Cancer Res* **65**(3): 1089-1096.
- Hiraoka, N., K. Onozato, et al. (2006). "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions." *Clin Cancer Res* **12**(18): 5423-5434.
- Hirashima, M., Y. Kashio, et al. (2004). "Galectin-9 in physiological and pathological conditions." *Glycoconj J* **19**(7-9): 593-600.
- Hock, H., M. Dorsch, et al. (1991). "Interleukin 7 induces CD4+ T cell-dependent tumor rejection." *J Exp Med* **174**(6): 1291-1298.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, et al. (2010). "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med* **363**(8): 711-723.

- Hoechst, B., T. Voigtlaender, et al. (2009). "Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor." Hepatology **50**(3): 799-807.
- Hofmann, M. and H. Pircher (2011). "E-cadherin promotes accumulation of a unique memory CD8 T-cell population in murine salivary glands." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16741-16746.
- Holdenrieder, S., J. von Pawel, et al. (2008). "Nucleosomes, ProGRP, NSE, CYFRA 21-1, and CEA in monitoring first-line chemotherapy of small cell lung cancer." Clin Cancer Res **14**(23): 7813-7821.
- Homey, B., A. Muller, et al. (2002). "Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer?" Nat Rev Immunol **2**(3): 175-184.
- Honda, S., H. Shirota-Ikejima, et al. (2009). "Integrin-linked kinase associated with integrin activation." Blood **113**(21): 5304-5313.
- Hopkins-Donaldson, S., A. Ziegler, et al. (2003). "Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation." Cell Death Differ **10**(3): 356-364.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Hu, C. E., J. Gan, et al. (2011). "Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function." Scand J Gastroenterol **46**(2): 156-164.
- Huang, B., P. Y. Pan, et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." Cancer Res **66**(2): 1123-1131.
- Huang, H., S. Hao, et al. (2007). "CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes." Immunology **120**(2): 148-159.
- Huerta, S., J. H. Heinzerling, et al. (2007). "Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF." J Surg Res **142**(1): 184-194.
- Hung, K., R. Hayashi, et al. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." J Exp Med **188**(12): 2357-2368.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." Nat Rev Immunol **3**(12): 973-983.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.
- IARC, I. A. f. R. o. C. (2001). "Ionizing radiation, part 2: some internally deposited radionuclides." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum
- Ibrahim, E. M., G. A. Kazkaz, et al. (2013). "Increased risk of second lung cancer in Hodgkin's lymphoma survivors: a meta-analysis." Lung **191**(1): 117-134.
- Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-853.
- Ignéy, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-288.
- Ignéy, F. H. and P. H. Krammer (2005). "Tumor counterattack: fact or fiction?" Cancer Immunol Immunother **54**(11): 1127-1136.
- Imaizumi, T., M. Kumagai, et al. (2002). "Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells." J Leukoc Biol **72**(3): 486-491.
- Inozume, T., K. Hanada, et al. (2010). "Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells." J Immunother **33**(9): 956-964.
- Irmeler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." Nature **388**(6638): 190-195.

- Ishida, Y., Y. Agata, et al. (1992). "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death." *EMBO J* **11**(11): 3887-3895.
- Ithychanda, S. S., M. Das, et al. (2009). "Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation." *J Biol Chem* **284**(7): 4713-4722.
- Ito, K. and S. J. Ralph (2012). "Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4(+) and CD8 (+) T cells and reduced cancer cell adherence." *Clin Exp Metastasis* **29**(6): 561-572.
- Ito, K., S. A. Scott, et al. (2011). "Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress." *Angiogenesis* **14**(3): 293-307.
- Itoh, K., C. D. Platsoucas, et al. (1988). "Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor." *J Exp Med* **168**(4): 1419-1441.
- Iwai, Y., M. Ishida, et al. (2002). "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12293-12297.
- Iwai, Y., S. Terawaki, et al. (2005). "PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells." *Int Immunol* **17**(2): 133-144.
- Iwai, Y., S. Terawaki, et al. (2003). "PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver." *J Exp Med* **198**(1): 39-50.
- Jaaskelainen, J., A. Maenpaa, et al. (1992). "Migration of recombinant IL-2-activated T and natural killer cells in the intercellular space of human H-2 glioma spheroids in vitro. A study on adhesion molecules involved." *J Immunol* **149**(1): 260-268.
- Jamrozik, K. (2006). "The epidemiology of colonialism." *Lancet* **368**(9529): 4-6.
- Jenkins, M. K. (1994). "The ups and downs of T cell costimulation." *Immunity* **1**(6): 443-446.
- Jenkinson, S. E., S. A. Whawell, et al. (2011). "The alphaE(CD103)beta7 integrin interacts with oral and skin keratinocytes in an E-cadherin-independent manner*." *Immunology* **132**(2): 188-196.
- Jiang, X., R. A. Clark, et al. (2012). "Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity." *Nature* **483**(7388): 227-231.
- Jin, H. T., A. C. Anderson, et al. (2010). "Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(33): 14733-14738.
- Jin, Z., E. R. McDonald, 3rd, et al. (2004). "Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis." *J Biol Chem* **279**(34): 35829-35839.
- Jochims, C. and J. Schlom (2011). "Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity." *Exp Biol Med (Maywood)* **236**(5): 567-579.
- Joffre, O., T. Santolaria, et al. (2008). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." *Nat Med* **14**(1): 88-92.
- Johansson-Lindbom, B., M. Svensson, et al. (2005). "Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing." *J Exp Med* **202**(8): 1063-1073.
- Johnsen, A. K., D. J. Templeton, et al. (1999). "Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis." *J Immunol* **163**(8): 4224-4231.
- Johrer, K., L. Pleyer, et al. (2008). "Tumour-immune cell interactions modulated by chemokines." *Expert Opin Biol Ther* **8**(3): 269-290.
- Joncker, N. T., M. A. Marloie, et al. (2006). "Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors." *Int J Cancer* **118**(5): 1205-1214.

- Jones, R. B., L. C. Ndhlovu, et al. (2008). "Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection." *J Exp Med* **205**(12): 2763-2779.
- Kadowaki, T., T. Arikawa, et al. (2012). "Galectin-9 signaling prolongs survival in murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages." *Clin Immunol* **142**(3): 296-307.
- Kaech, S. M., S. Hemby, et al. (2002). "Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation." *Cell* **111**(6): 837-851.
- Kageshita, T., Y. Kashio, et al. (2002). "Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance." *Int J Cancer* **99**(6): 809-816.
- Kagi, D., F. Vignaux, et al. (1994). "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science* **265**(5171): 528-530.
- Kalos, M., B. L. Levine, et al. (2011). "T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia." *Sci Transl Med* **3**(95): 95ra73.
- Kamphausen, E., C. Kellert, et al. (2010). "Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma." *Cancer Immunol Immunother* **59**(8): 1273-1284.
- Kanai, Y., T. Satoh, et al. (2012). "Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis." *Acta Derm Venereol* **92**(4): 367-371.
- Karecla, P. I., S. J. Bowden, et al. (1995). "Recognition of E-cadherin on epithelial cells by the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 (alpha E beta 7)." *Eur J Immunol* **25**(3): 852-856.
- Katoh, D., K. Nagaharu, et al. (2013). "Binding of alphavbeta1 and alphavbeta6 integrins to tenascin-C induces epithelial-mesenchymal transition-like change of breast cancer cells." *Oncogenesis* **2**: e65.
- Kaufmann, D. E., D. G. Kavanagh, et al. (2007). "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction." *Nat Immunol* **8**(11): 1246-1254.
- Kayagaki, N., A. Kawasaki, et al. (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." *J Exp Med* **182**(6): 1777-1783.
- Keir, M. E., M. J. Butte, et al. (2008). "PD-1 and its ligands in tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704.
- Keir, M. E., Y. E. Latchman, et al. (2005). "Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes." *J Immunol* **175**(11): 7372-7379.
- Kelly, J. M., P. K. Darcy, et al. (2002). "Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection." *Nat Immunol* **3**(1): 83-90.
- Kenfield, S. A., E. K. Wei, et al. (2008). "Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer." *Tob Control* **17**(3): 198-204.
- Kepp, O., A. Tesniere, et al. (2009). "The immunogenicity of tumor cell death." *Curr Opin Oncol* **21**(1): 71-76.
- Khademi, M., Z. Illes, et al. (2004). "T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis." *J Immunol* **172**(11): 7169-7176.
- Khan, A. N., C. J. Gregorie, et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells." *Cancer Immunol Immunother* **57**(5): 647-654.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." *Nat Immunol* **4**(4): 337-342.
- Khong, H. T., Q. J. Wang, et al. (2004). "Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression." *J Immunother* **27**(3): 184-190.

- Kiema, T., Y. Lad, et al. (2006). "The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin." Mol Cell **21**(3): 337-347.
- Kiessling, R., K. Wasserman, et al. (1999). "Tumor-induced immune dysfunction." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 353-362.
- Kilshaw, P. J. and K. C. Baker (1988). "A unique surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the mouse." Immunol Lett **18**(2): 149-154.
- Kilshaw, P. J. and J. M. Higgins (2002). "Alpha E: no more rejection?" J Exp Med **196**(7): 873-875.
- Kilshaw, P. J. and P. Karella (1997). "Structure and function of the mucosal T-cell integrin alpha E beta 7." Biochem Soc Trans **25**(2): 433-439.
- Kilshaw, P. J. and S. J. Murrant (1990). "A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine." Eur J Immunol **20**(10): 2201-2207.
- Kim, M., C. V. Carman, et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." Science **301**(5640): 1720-1725.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2004). "The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy." Cancer **100**(11): 2281-2291.
- Kinashi, T. (2005). "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." Nat Rev Immunol **5**(7): 546-559.
- Klein, G. (1966). "Tumor antigens." Annu Rev Microbiol **20**: 223-252.
- Koguchi, K., D. E. Anderson, et al. (2006). "Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis." J Exp Med **203**(6): 1413-1418.
- Konishi, J., K. Yamazaki, et al. (2004). "B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression." Clin Cancer Res **10**(15): 5094-5100.
- Koopman, L. A., W. E. Corver, et al. (2000). "Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer." J Exp Med **191**(6): 961-976.
- Kovalova, A., M. Ledvina, et al. (2010). "Synthetic N-acetyl-D-glucosamine based fully branched tetrasaccharide, a mimetic of the endogenous ligand for CD69, activates CD69+ killer lymphocytes upon dimerization via a hydrophilic flexible linker." J Med Chem **53**(10): 4050-4065.
- Kozako, T., M. Yoshimitsu, et al. (2009). "PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients." Leukemia **23**(2): 375-382.
- Kristjansen, P. E. and H. H. Hansen (1990). "Management of small cell lung cancer: a summary of the Third International Association for the Study of Lung Cancer Workshop on Small Cell Lung Cancer." J Natl Cancer Inst **82**(4): 263-266.
- Kroner, A., M. Mehling, et al. (2005). "A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis." Ann Neurol **58**(1): 50-57.
- Krupnick, A. S., A. E. Gelman, et al. (2005). "Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **175**(10): 6265-6270.
- Kuchroo, V. K., J. H. Meyers, et al. (2006). "TIM family of genes in immunity and tolerance." Adv Immunol **91**: 227-249.
- Kuhn, J. R. and M. Poenie (2002). "Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing." Immunity **16**(1): 111-121.
- Kupper, T. S. and R. C. Fuhlbrigge (2004). "Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences." Nat Rev Immunol **4**(3): 211-222.
- Kuroda, J., M. Yamamoto, et al. (2010). "Targeting activating transcription factor 3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous leukemia." Mol Cancer Res **8**(7): 994-1001.
- Kutlesa, S., J. T. Wessels, et al. (2002). "E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation." J Cell Sci **115**(Pt 23): 4505-4515.

- Laffont, S., K. R. Siddiqui, et al. (2010). "Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells." *Eur J Immunol* **40**(7): 1877-1883.
- Lahm, H., S. Andre, et al. (2001). "Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures." *J Cancer Res Clin Oncol* **127**(6): 375-386.
- Landowski, T. H., N. Qu, et al. (1997). "Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma." *Blood* **90**(11): 4266-4270.
- Langers, I., V. M. Renoux, et al. (2012). "Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis." *Biologics* **6**: 73-82.
- Larjava, H., E. F. Plow, et al. (2008). "Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion." *EMBO Rep* **9**(12): 1203-1208.
- Larson, R. S., A. L. Corbi, et al. (1989). "Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily." *J Cell Biol* **108**(2): 703-712.
- Latchman, Y. E., S. C. Liang, et al. (2004). "PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10691-10696.
- Le Floc'h, A., A. Jalil, et al. (2011). "Minimal engagement of CD103 on cytotoxic T lymphocytes with an E-cadherin-Fc molecule triggers lytic granule polarization via a phospholipase Cgamma-dependent pathway." *Cancer Res* **71**(2): 328-338.
- Le Floc'h, A., A. Jalil, et al. (2007). "Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis." *J Exp Med* **204**(3): 559-570.
- Le Pechoux, C., F. Dhermain, et al. (2004). "[Modalities of radiotherapy in small cell lung cancer: thoracic radiotherapy and prophylactic cerebral irradiation]." *Rev Pneumol Clin* **60**(5 Pt 2): 3S91-103.
- Leal-Pinto, E., W. Tao, et al. (1997). "Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel." *J Biol Chem* **272**(1): 617-625.
- Lee, I., L. Wang, et al. (2005). "Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor." *J Exp Med* **201**(7): 1037-1044.
- Lee, J. O., P. Rieu, et al. (1995). "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)." *Cell* **80**(4): 631-638.
- Leek, R. D. and A. L. Harris (2002). "Tumor-associated macrophages in breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**(2): 177-189.
- Lefrancois, L., T. A. Barrett, et al. (1994). "Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells." *Eur J Immunol* **24**(3): 635-640.
- Lefrancois, L., C. M. Parker, et al. (1999). "The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response." *J Exp Med* **189**(10): 1631-1638.
- Legate, K. R. and R. Fassler (2009). "Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails." *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 187-198.
- Lehmann, J., J. Huehn, et al. (2002). "Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13031-13036.
- Lenardo, M., K. M. Chan, et al. (1999). "Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment." *Annu Rev Immunol* **17**: 221-253.
- Lettini, A. A., M. Guidoboni, et al. (2007). "Epigenetic remodelling of DNA in cancer." *Histol Histopathol* **22**(12): 1413-1424.
- Ley, K. and G. S. Kansas (2004). "Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation." *Nat Rev Immunol* **4**(5): 325-335.
- Li, B., A. Samanta, et al. (2006). "FOXP3 ensembles in T-cell regulation." *Immunol Rev* **212**: 99-113.

- Liang, M., M. Ueno, et al. (2008). "Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* **134**(8): 899-907.
- Liang, S. C., Y. E. Latchman, et al. (2003). "Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses." *Eur J Immunol* **33**(10): 2706-2716.
- Liddington, R. C. and M. H. Ginsberg (2002). "Integrin activation takes shape." *J Cell Biol* **158**(5): 833-839.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, et al. (2001). "Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy." *J Exp Med* **193**(6): 727-740.
- Linthicum, D. S., J. J. Munoz, et al. (1982). "Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system." *Cell Immunol* **73**(2): 299-310.
- Liu, C., Y. Lou, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice." *J Clin Invest* **118**(3): 1165-1175.
- Liu, H. Y., Z. L. Huang, et al. (2008). "Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model." *World J Gastroenterol* **14**(48): 7386-7391.
- Liu, K., B. A. Anthony, et al. (2011). "CD103 deficiency prevents graft-versus-host disease but spares graft-versus-tumor effects mediated by alloreactive CD8 T cells." *PLoS One* **6**(7): e21968.
- Liu, Y., Q. Lan, et al. (2014). "Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8+ Foxp3- CD103+ regulatory T cells." *J Mol Cell Biol* **6**(1): 81-92.
- Liu, Y., Q. Shu, et al. (2010). "Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity." *Clin Immunol* **137**(2): 288-295.
- Liu, Y., I. Teige, et al. (2006). "Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE." *Nat Med* **12**(5): 518-525.
- Liu, Y., J. A. Van Ginderachter, et al. (2003). "Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells." *J Immunol* **170**(10): 5064-5074.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." *J Immunol* **169**(5): 2756-2761.
- Lob, S., A. Konigsrainer, et al. (2009). "IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism." *Cancer Immunol Immunother* **58**(1): 153-157.
- Loeb, L. A., K. R. Loeb, et al. (2003). "Multiple mutations and cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 776-781.
- Lohmeyer, J., J. Friedrich, et al. (1999). "Expression of mucosa-related integrin alphaEbeta7 on alveolar T cells in interstitial lung diseases." *Clin Exp Immunol* **116**(2): 340-346.
- Loos, M., R. Langer, et al. (2011). "Clinical significance of the costimulatory molecule B7-H1 in Barrett carcinoma." *Ann Thorac Surg* **91**(4): 1025-1031.
- Lu, L., M. B. Werneck, et al. (2006). "The immunoregulatory effects of Qa-1." *Immunol Rev* **212**: 51-59.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, et al. (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." *Clin Dev Immunol* **2012**: 925135.
- Ludviksson, B. R., W. Strober, et al. (1999). "Administration of mAb against alpha E beta 7 prevents and ameliorates immunization-induced colitis in IL-2-/- mice." *J Immunol* **162**(8): 4975-4982.
- Lugini, L., P. Matarrese, et al. (2006). "Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells." *Cancer Res* **66**(7): 3629-3638.
- Luo, B. H. and T. A. Springer (2006). "Integrin structures and conformational signaling." *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 579-586.
- Lyubchenko, T. A., G. A. Wurth, et al. (2001). "Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing." *Immunity* **15**(5): 847-859.

- Macatonia, S. E., N. A. Hosken, et al. (1995). "Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells." *J Immunol* **154**(10): 5071-5079.
- Mackay, L. K., A. Rahimpour, et al. (2013). "The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin." *Nat Immunol* **14**(12): 1294-1301.
- Mackay, L. K., A. T. Stock, et al. (2012). "Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(18): 7037-7042.
- Mackensen, A., G. Carcelain, et al. (1994). "Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma." *J Clin Invest* **93**(4): 1397-1402.
- Magner, W. J., A. L. Kazim, et al. (2000). "Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors." *J Immunol* **165**(12): 7017-7024.
- Manes, S., E. Mira, et al. (2003). "CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner." *J Exp Med* **198**(9): 1381-1389.
- Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.
- Mantovani, A., S. Sozzani, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* **23**(11): 549-555.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* **201**(7): 1061-1067.
- Marincola, F. M., E. M. Jaffee, et al. (2000). "Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance." *Adv Immunol* **74**: 181-273.
- Masopust, D., D. Choo, et al. (2010). "Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium." *J Exp Med* **207**(3): 553-564.
- Masson, F., A. M. Mount, et al. (2008). "Dendritic cells: driving the differentiation programme of T cells in viral infections." *Immunol Cell Biol* **86**(4): 333-342.
- Matloubian, M., C. G. Lo, et al. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." *Nature* **427**(6972): 355-360.
- Matteoli, G., E. Mazzini, et al. (2010). "Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction." *Gut* **59**(5): 595-604.
- McNeill, H., M. Ozawa, et al. (1990). "Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity." *Cell* **62**(2): 309-316.
- Medema, J. P., J. de Jong, et al. (2001). "Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11515-11520.
- Meissner, M., T. E. Reichert, et al. (2005). "Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome." *Clin Cancer Res* **11**(7): 2552-2560.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." *Nat Rev Immunol* **4**(10): 762-774.
- Mellstedt, H., J. Vansteenkiste, et al. (2011). "Vaccines for the treatment of non-small cell lung cancer: investigational approaches and clinical experience." *Lung Cancer* **73**(1): 11-17.
- Mempel TR, H. S., Von Andrian UH (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* **427**: 154-159.
- Mempel, U. H. v. A. T. R. (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes." *Nature Reviews Immunology* **3**, 867-878
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, et al. (1998). "Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **92**(12): 4778-4791.
- Michael, K. E., D. W. Dumbauld, et al. (2009). "Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation." *Mol Biol Cell* **20**(9): 2508-2519.
- Micheau, O. and J. Tschoopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-190.

- Miller MJ, W. S., Cahalan MD, Parker I (2003). "Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
- Miller MJ, W. S., Parker I, Cahalan MD (2002). "Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node." Science **296**: 1869-1873.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" Nat Rev Immunol **4**(11): 841-855.
- Mokrani, M., J. Klibi, et al. (2014). "Smad and NFAT pathways cooperate to induce CD103 expression in human CD8 T lymphocytes." J Immunol **192**(5): 2471-2479.
- Molon, B., S. Ugel, et al. (2011). "Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells." J Exp Med **208**(10): 1949-1962.
- Monks CR, F. B., Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**: 82-86.
- Monney, L., C. A. Sabatos, et al. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." Nature **415**(6871): 536-541.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-173.
- Moss, A. C., G. M. Jacobson, et al. (2009). "SCG3 transcript in peripheral blood is a prognostic biomarker for REST-deficient small cell lung cancer." Clin Cancer Res **15**(1): 274-283.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (1999). "Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression." Int J Cancer **83**(6): 780-789.
- Mule, J. J., M. Custer, et al. (1996). "RANTES secretion by gene-modified tumor cells results in loss of tumorigenicity in vivo: role of immune cell subpopulations." Hum Gene Ther **7**(13): 1545-1553.
- Munger, J. S., X. Huang, et al. (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.
- Murali-Krishna, K., J. D. Altman, et al. (1998). "Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection." Immunity **8**(2): 177-187.
- Murdoch, C., M. Muthana, et al. (2008). "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis." Nat Rev Cancer **8**(8): 618-631.
- Nagar, B., M. Overduin, et al. (1996). "Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization." Nature **380**(6572): 360-364.
- Nagaraj, S., M. Collazo, et al. (2009). "Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease." Cancer Res **69**(19): 7503-7506.
- Nagaraj, S., K. Gupta, et al. (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." Nat Med **13**(7): 828-835.
- Nakashima, M., K. Sonoda, et al. (1999). "Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1." Nat Med **5**(8): 938-942.
- Nakazaki, Y., H. Hase, et al. (2006). "Serial analysis of gene expression in progressing and regressing mouse tumors implicates the involvement of RANTES and TARC in antitumor immune responses." Mol Ther **14**(4): 599-606.
- Nangia-Makker, P., V. Hogan, et al. (2002). "Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin." J Natl Cancer Inst **94**(24): 1854-1862.
- Ngiow, S. F., M. W. Teng, et al. (2011). "Prospects for TIM3-Targeted Antitumor Immunotherapy." Cancer Res **71**(21): 6567-6571.
- Ngiow, S. F., B. von Scheidt, et al. (2011). "Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors." Cancer Res **71**(10): 3540-3551.
- Nicole, J., Anneli Peters¹, Ana C. Anderson¹, and Vijay K. Kuchroo^{1,2} (2012). "Immune Checkpoints in CNS Autoimmunity." Immunol Rev.
- Nishikawa, H. and S. Sakaguchi (2010). "Regulatory T cells in tumor immunity." Int J Cancer **127**(4): 759-767.

- Nishimura, H., T. Honjo, et al. (2000). "Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice." *J Exp Med* **191**(5): 891-898.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* **11**(2): 141-151.
- Nishimura, H., T. Okazaki, et al. (2001). "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice." *Science* **291**(5502): 319-322.
- Nishinakagawa, T., S. Fujii, et al. (2010). "Analysis of cell cycle arrest and apoptosis induced by RCAS1." *Int J Mol Med* **25**(5): 717-722.
- Niwa, H., T. Satoh, et al. (2009). "Stable form of galectin-9, a Tim-3 ligand, inhibits contact hypersensitivity and psoriatic reactions: a potent therapeutic tool for Th1- and/or Th17-mediated skin inflammation." *Clin Immunol* **132**(2): 184-194.
- Nobumoto, A., K. Nagahara, et al. (2008). "Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices." *Glycobiology* **18**(9): 735-744.
- Nomi, T., M. Sho, et al. (2007). "Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* **13**(7): 2151-2157.
- O'Sullivan, C., C. E. Lewis, et al. (1993). "Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma." *Lancet* **342**(8864): 148-149.
- Ohigashi, Y., M. Sho, et al. (2005). "Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer." *Clin Cancer Res* **11**(8): 2947-2953.
- Ohm, J. E., D. I. Gabrilovich, et al. (2003). "VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression." *Blood* **101**(12): 4878-4886.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2006). "The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance." *Trends Immunol* **27**(4): 195-201.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2007). "PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application." *Int Immunol* **19**(7): 813-824.
- Okazaki, T., A. Maeda, et al. (2001). "PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13866-13871.
- Old, L. J. and E. A. Boyse (1964). "Immunology of Experimental Tumors." *Annu Rev Med* **15**: 167-186.
- Oppenheim, D. E., S. J. Roberts, et al. (2005). "Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance." *Nat Immunol* **6**(9): 928-937.
- Oxley, C. L., N. J. Anthis, et al. (2008). "An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding." *J Biol Chem* **283**(9): 5420-5426.
- Palmer, E. M. and G. A. van Seventer (1997). "Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals." *J Immunol* **158**(6): 2654-2662.
- Pandiyan, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-1362.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264.
- Parish, I. A. and S. M. Kaech (2009). "Diversity in CD8(+) T cell differentiation." *Curr Opin Immunol* **21**(3): 291-297.
- Parker, C. M., K. L. Cepek, et al. (1992). "A family of beta 7 integrins on human mucosal lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1924-1928.
- Parkin, D. M. and S. C. Darby (2011). "12. Cancers in 2010 attributable to ionising radiation exposure in the UK." *Br J Cancer* **105** Suppl 2: S57-65.
- Parry, R. V., J. M. Chemnitz, et al. (2005). "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms." *Mol Cell Biol* **25**(21): 9543-9553.

- Paterson, A. M., K. E. Brown, et al. (2011). "The programmed death-1 ligand 1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo." *J Immunol* **187**(3): 1097-1105.
- Paul, W. E. a. R. A. S. (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." *Cell* **76**(2): 241-51.
- Peli, J., M. Schroter, et al. (1999). "Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas." *EMBO J* **18**(7): 1824-1831.
- Pelucchi, C., E. Pira, et al. (2006). "Occupational silica exposure and lung cancer risk: a review of epidemiological studies 1996-2005." *Ann Oncol* **17**(7): 1039-1050.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." *Immunity* **21**(3): 401-413.
- Peranzoni, E., S. Zilio, et al. (2010). "Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition." *Curr Opin Immunol* **22**(2): 238-244.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, et al. (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." *Immunity* **6**(4): 411-417.
- Petrovas, C., J. P. Casazza, et al. (2006). "PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection." *J Exp Med* **203**(10): 2281-2292.
- Pfaff, M., S. Liu, et al. (1998). "Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins." *J Biol Chem* **273**(11): 6104-6109.
- Piet, B., G. J. de Bree, et al. (2011). "CD8(+) T cells with an intraepithelial phenotype upregulate cytotoxic function upon influenza infection in human lung." *J Clin Invest* **121**(6): 2254-2263.
- Pilon-Thomas, S., L. Kuhn, et al. (2012). "Efficacy of adoptive cell transfer of tumor-infiltrating lymphocytes after lymphopenia induction for metastatic melanoma." *J Immunother* **35**(8): 615-620.
- Pipkin, M. E. and J. Lieberman (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." *Curr Opin Immunol* **19**(3): 301-308.
- Pirozynski, M. (2006). "100 years of lung cancer." *Respir Med* **100**(12): 2073-2084.
- Plow, E. F., T. A. Haas, et al. (2000). "Ligand binding to integrins." *J Biol Chem* **275**(29): 21785-21788.
- Porgador, A., D. Snyder, et al. (1996). "Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells." *J Immunol* **156**(8): 2918-2926.
- Prieto, P. A., J. C. Yang, et al. (2012). "CTLA-4 blockade with ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma." *Clin Cancer Res* **18**(7): 2039-2047.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." *Nat Immunol* **6**(3): 280-286.
- Pudney, J. and D. J. Anderson (1995). "Immunobiology of the human penile urethra." *Am J Pathol* **147**(1): 155-165.
- Purwar, R., J. Campbell, et al. (2011). "Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity." *PLoS One* **6**(1): e16245.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells." *Immunity* **12**(6): 677-686.
- Quinn, E., N. Hawkins, et al. (2003). "CD103+ intraepithelial lymphocytes--a unique population in microsatellite unstable sporadic colorectal cancer." *Eur J Cancer* **39**(4): 469-475.
- Radoja, S., M. Saio, et al. (2001). "CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are primed for Fas-mediated activation-induced cell death but are not apoptotic in situ." *J Immunol* **166**(10): 6074-6083.
- Radoja, S., M. Saio, et al. (2001). "CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis." *J Immunol* **167**(9): 5042-5051.
- Ramsay, A. G., A. J. Clear, et al. (2012). "Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer." *Blood* **120**(7): 1412-1421.
- Reichmann, E. (2002). "The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression." *Semin Cancer Biol* **12**(4): 309-315.

- Ren, X., F. Ye, et al. (2007). "Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *Cell Death Differ* **14**(12): 2076-2084.
- Rietzler, M., M. Bittner, et al. (1998). "The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins." *J Biol Chem* **273**(42): 27459-27466.
- Riley, J. L. (2009). "PD-1 signaling in primary T cells." *Immunol Rev* **229**(1): 114-125.
- Robbins, P. F., M. E. Dudley, et al. (2004). "Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy." *J Immunol* **173**(12): 7125-7130.
- Robertson, H., W. K. Wong, et al. (2001). "Relationship between TGFbeta(1), intratubular CD103 positive T cells and acute renal allograft rejection." *Transplant Proc* **33**(1-2): 1159.
- Rodriguez-Manzanet, R., R. DeKruyff, et al. (2009). "The costimulatory role of TIM molecules." *Immunol Rev* **229**(1): 259-270.
- Romero, P., A. Zippelius, et al. (2007). "Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes." *J Immunol* **178**(7): 4112-4119.
- Rosenberg, S. A. (2011). "Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer--what clinicians need to know." *Nat Rev Clin Oncol* **8**(10): 577-585.
- Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2004). "Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** Suppl 2: 14639-14645.
- Rosenberg, S. A., N. P. Restifo, et al. (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **8**(4): 299-308.
- Russell, G. J., C. M. Parker, et al. (1994). "Distinct structural and functional epitopes of the alpha E beta 7 integrin." *Eur J Immunol* **24**(11): 2832-2841.
- Russell, J. H. and T. J. Ley (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **20**: 323-370.
- Sabatos, C. A., S. Chakravarti, et al. (2003). "Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance." *Nat Immunol* **4**(11): 1102-1110.
- Sainz-Perez, A., A. Lim, et al. (2012). "The T-cell receptor repertoire of tumor-infiltrating regulatory T lymphocytes is skewed toward public sequences." *Cancer Res* **72**(14): 3557-3569.
- Saito, H., S. Tsujitani, et al. (1998). "Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue." *Br J Cancer* **78**(12): 1573-1577.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.
- Sakuishi, K., L. Apetoh, et al. (2010). "Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity." *J Exp Med* **207**(10): 2187-2194.
- Salama, A. D., T. Chitnis, et al. (2003). "Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* **198**(1): 71-78.
- Salama, A. K. and F. S. Hodi (2011). "Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4." *Clin Cancer Res* **17**(14): 4622-4628.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-712.
- Salomon, B., L. Rhee, et al. (2001). "Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice." *J Exp Med* **194**(5): 677-684.
- Samet, J. M. (2004). "Environmental causes of lung cancer: what do we know in 2003?" *Chest* **125**(5 Suppl): 80S-83S.
- Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, et al. (2003). "Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance." *Nat Immunol* **4**(11): 1093-1101.
- Sarnacki, S., B. Begue, et al. (1992). "Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody." *Eur J Immunol* **22**(11): 2887-2892.

- Sasada, T., M. Kimura, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression." Cancer **98**(5): 1089-1099.
- Sato, E., S. H. Olson, et al. (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-18543.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." EMBO J **17**(6): 1675-1687.
- Schieferdecker, H. L., R. Ullrich, et al. (1990). "The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen." J Immunol **144**(7): 2541-2549.
- Schlickum, S., H. Sennefelder, et al. (2008). "Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion." Blood **112**(3): 619-625.
- Schoenfeld (1982). "Partial residuals for the proportional hazards regression model." Biometrika **69**:239-241.
- Schon, M. P., A. Arya, et al. (1999). "Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice." J Immunol **162**(11): 6641-6649.
- Schonfeld, S. J., R. E. Curtis, et al. (2012). "The risk of a second primary lung cancer after a first invasive breast cancer according to estrogen receptor status." Cancer Causes Control **23**(10): 1721-1728.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science **331**(6024): 1565-1570.
- Schreiner, B., M. Mitsdoerffer, et al. (2004). "Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **155**(1-2): 172-182.
- Schwab SR, P. J., Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG (2005). "Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients
" Science **309**: 1735-1739.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-599.
- Seki, M., S. Oomizu, et al. (2008). "Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis." Clin Immunol **127**(1): 78-88.
- Seliger, B. (2008). "Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors." Cancer Immunol Immunother **57**(11): 1719-1726.
- Seliger, B., A. Hohne, et al. (1996). "Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression." Cancer Res **56**(8): 1756-1760.
- Seliger, B., M. J. Maeurer, et al. (2000). "Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth." Immunol Today **21**(9): 455-464.
- Seliger, B., U. Ritz, et al. (2001). "Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway." Cancer Res **61**(24): 8647-8650.
- Seliger, B., K. Schreiber, et al. (2001). "Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumor cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines." Tissue Antigens **57**(1): 39-45.
- Senetar, M. A., C. L. Moncman, et al. (2007). "Talin2 is induced during striated muscle differentiation and is targeted to stable adhesion complexes in mature muscle." Cell Motil Cytoskeleton **64**(3): 157-173.
- Sevko, A. and V. Umansky (2013). "Myeloid-derived suppressor cells interact with tumors in terms of myelopoiesis, tumorigenesis and immunosuppression: thick as thieves." J Cancer **4**(1): 3-11.

- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* **410**(6832): 1107-1111.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* **2**(2): 116-126.
- Shaw, S., G. E. Luce, et al. (1986). "Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones." *Nature* **323**(6085): 262-264.
- Shen, Y. Q., J. Q. Zhang, et al. (2007). "Low-molecular-weight protein (LMP)2/LMP7 abnormality underlies the downregulation of human leukocyte antigen class I antigen in a hepatocellular carcinoma cell line." *J Gastroenterol Hepatol* **22**(7): 1155-1161.
- Sheridan, B. S. and L. Lefrancois (2010). "Intraepithelial lymphocytes: to serve and protect." *Curr Gastroenterol Rep* **12**(6): 513-521.
- Sheridan, B. S. and L. Lefrancois (2011). "Regional and mucosal memory T cells." *Nat Immunol* **12**(6): 485-491.
- Shi, F., M. Shi, et al. (2011). "PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients." *Int J Cancer* **128**(4): 887-896.
- Shiels, M. S., S. R. Cole, et al. (2009). "A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals." *J Acquir Immune Defic Syndr* **52**(5): 611-622.
- Shimaoka, M., T. Xiao, et al. (2003). "Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation." *Cell* **112**(1): 99-111.
- Shiow, L. R., D. B. Rosen, et al. (2006). "CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs." *Nature* **440**(7083): 540-544.
- Shirai, A., M. Furukawa, et al. (2003). "Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck." *Laryngoscope* **113**(11): 1955-1960.
- Sica, A., T. Schioppa, et al. (2006). "Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy." *Eur J Cancer* **42**(6): 717-727.
- Sica, G. L., I. H. Choi, et al. (2003). "B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity." *Immunity* **18**(6): 849-861.
- Sillett, H. K., J. Southgate, et al. (1999). "Expression of activation and costimulatory elements by human intestinal intraepithelial lymphocytes." *Scand J Immunol* **50**(1): 52-60.
- Silverman, D. T., C. M. Samanic, et al. (2012). "The Diesel Exhaust in Miners study: a nested case-control study of lung cancer and diesel exhaust." *J Natl Cancer Inst* **104**(11): 855-868.
- Simonitsch, I., B. Volc-Platzter, et al. (1994). "Expression of monoclonal antibody HML-1-defined alpha E beta 7 integrin in cutaneous T cell lymphoma." *Am J Pathol* **145**(5): 1148-1158.
- Singh, S., S. Pillai, et al. (2011). "Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis." *J Oncol* **2011**: 456743.
- Skon, C. N., J. Y. Lee, et al. (2013). "Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells." *Nat Immunol* **14**(12): 1285-1293.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et al. (2001). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." *Int Immunol* **13**(4): 459-463.
- Smyth, M. J., N. Y. Crowe, et al. (2002). "Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide." *Blood* **99**(4): 1259-1266.
- Smyth, M. J., G. P. Dunn, et al. (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." *Adv Immunol* **90**: 1-50.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* **191**(4): 661-668.
- Sonoda, K. (2011). "Novel therapeutic strategies to target RCAS1, which induces apoptosis via ectodomain shedding." *Histol Histopathol* **26**(11): 1475-1486.
- Sperling, A. I. and H. H. Wortis (1989). "CD4-, CD8- gamma/delta cells from normal mice respond to a syngeneic B cell lymphoma and can induce its differentiation." *Int Immunol* **1**(4): 434-442.

- Srivastava, P. (2002). "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **2**(3): 185-194.
- Stayner, L., J. Bena, et al. (2007). "Lung cancer risk and workplace exposure to environmental tobacco smoke." Am J Public Health **97**(3): 545-551.
- Steinbrink, K., E. Graulich, et al. (2002). "CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity." Blood **99**(7): 2468-2476.
- Steinbrink, K., M. Wolfl, et al. (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." J Immunol **159**(10): 4772-4780.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci **987**: 15-25.
- Stennicke, H. R., J. M. Jurgensmeier, et al. (1998). "Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8." J Biol Chem **273**(42): 27084-27090.
- Stewart, M. P., A. McDowall, et al. (1998). "LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain." J Cell Biol **140**(3): 699-707.
- Stinchcombe, J. C., E. Majorovits, et al. (2006). "Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse." Nature **443**(7110): 462-465.
- Street, S. E., E. Cretney, et al. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-197.
- Street, S. E., Y. Hayakawa, et al. (2004). "Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells." J Exp Med **199**(6): 879-884.
- Strobl, H. and W. Knapp (1999). "TGF-beta1 regulation of dendritic cells." Microbes Infect **1**(15): 1283-1290.
- Strome, S. E., H. Dong, et al. (2003). "B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(19): 6501-6505.
- Stutman, O. (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." Science **183**(4124): 534-536.
- Subudhi, S. K., P. Zhou, et al. (2004). "Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection." J Clin Invest **113**(5): 694-700.
- Suffia, I., S. K. Reckling, et al. (2005). "A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection." J Immunol **174**(9): 5444-5455.
- Sun, Y., Y. Wang, et al. (2006). "B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer." Lung Cancer **53**(2): 143-151.
- Sung, S. S., S. M. Fu, et al. (2006). "A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins." J Immunol **176**(4): 2161-2172.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-1146.
- Sziksz, E., G. T. Kozma, et al. (2010). "Galectin-9 in allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice." Int Arch Allergy Immunol **151**(4): 308-317.
- Tabbekh, M., K. Franciszkiewicz, et al. (2011). "Rescue of tumor-infiltrating lymphocytes from activation-induced cell death enhances the antitumor CTL response in CD5-deficient mice." J Immunol **187**(1): 102-109.
- Tachimori, A., N. Yamada, et al. (2005). "Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma." Eur J Cancer **41**(12): 1802-1810.
- Tadmor, T., D. Attias, et al. (2011). "Myeloid-derived suppressor cells--their role in haemato-oncological malignancies and other cancers and possible implications for therapy." Br J Haematol **153**(5): 557-567.
- Tadokoro, S., S. J. Shattil, et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642): 103-106.
- Takagi, J., B. M. Petre, et al. (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." Cell **110**(5): 599-511.

- Takahashi, A., K. Kono, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines." Cancer Immunol Immunother **53**(6): 543-550.
- Takahashi, H., H. Iizuka, et al. (2001). "RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin." J Dermatol Sci **26**(2): 140-144.
- Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, et al. (2010). "Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors." J Immunol **184**(9): 4696-4707.
- Takata, H. and M. Takiguchi (2006). "Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules." J Immunol **177**(7): 4330-4340.
- Tamura, H., H. Dong, et al. (2001). "B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function." Blood **97**(6): 1809-1816.
- Taraszk, K. S., J. M. Higgins, et al. (2000). "Molecular basis for leukocyte integrin alpha(E)beta(7) adhesion to epithelial (E)-cadherin." J Exp Med **191**(9): 1555-1567.
- Taunk, J., A. I. Roberts, et al. (1992). "Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors." Gastroenterology **102**(1): 69-75.
- Taylor, R., F. Najafi, et al. (2007). "Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent." Int J Epidemiol **36**(5): 1048-1059.
- Teijaro, J. R., D. Turner, et al. (2011). "Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection." J Immunol **187**(11): 5510-5514.
- Terabe, M., S. Matsui, et al. (2000). "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway." Nat Immunol **1**(6): 515-520.
- Terabe, M., J. Swann, et al. (2005). "A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance." J Exp Med **202**(12): 1627-1633.
- Thangavelu, G., J. C. Parkman, et al. (2011). "Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis." J Autoimmun **36**(3-4): 301-312.
- Thiery, J., S. Abouzahr, et al. (2005). "p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways." J Immunol **174**(2): 871-878.
- Tijssen, V. L., S. Hulsmans, et al. (2008). "The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells." Am J Pathol **172**(2): 545-553.
- Thomas, D. A., C. Du, et al. (2000). "DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis." Immunity **12**(6): 621-632.
- Thomas, L. (1982). "On immunosurveillance in human cancer." Yale J Biol Med **55**(3-4): 329-333.
- Thurner, B., I. Haendle, et al. (1999). "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." J Exp Med **190**(11): 1669-1678.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-547.
- Tomasini, P., N. Khobta, et al. (2012). "Ipilimumab: its potential in non-small cell lung cancer." Ther Adv Med Oncol **4**(2): 43-50.
- Topalian, S. L., F. S. Hodi, et al. (2012). "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." N Engl J Med **366**(26): 2443-2454.
- Tosolini, M., A. Kirilovsky, et al. (2011). "Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer." Cancer Res **71**(4): 1263-1271.
- Trautmann, L., L. Janbazian, et al. (2006). "Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction." Nat Med **12**(10): 1198-1202.

- Tschopp, J., D. Masson, et al. (1986). "Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis." *Nature* **322**(6082): 831-834.
- Tseng, S. Y., M. Otsuji, et al. (2001). "B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells." *J Exp Med* **193**(7): 839-846.
- Tsoi, C. T. and L. A. Tse (2012). "Professional drivers and lung cancer: a systematic review and meta-analysis." *Occup Environ Med* **69**(11): 831-836.
- Tsutsui, S., K. Yasuda, et al. (2005). "Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density." *Oncol Rep* **14**(2): 425-431.
- Tureci, O., U. Mack, et al. (2006). "Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1." *Cancer Lett* **236**(1): 64-71.
- Tureci, O., H. Schmitt, et al. (1997). "Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease." *J Biol Chem* **272**(10): 6416-6422.
- Turner, D. L., C. L. Gordon, et al. (2014). "Tissue-resident T cells, in situ immunity and transplantation." *Immunol Rev* **258**(1): 150-166.
- Uekusa, Y., W. G. Yu, et al. (2002). "A pivotal role for CC chemokine receptor 5 in T-cell migration to tumor sites induced by interleukin 12 treatment in tumor-bearing mice." *Cancer Res* **62**(13): 3751-3758.
- Ugolini, S., C. Arpin, et al. (2001). "Involvement of inhibitory NKR in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells." *Nat Immunol* **2**(5): 430-435.
- Ugurel, S., G. Rappl, et al. (2001). "Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients." *Clin Cancer Res* **7**(5): 1282-1286.
- Ugurel, S., D. Schrama, et al. (2008). "Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **57**(5): 685-691.
- Uss, E., A. T. Rowshani, et al. (2006). "CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells." *J Immunol* **177**(5): 2775-2783.
- Valitutti, S. (2008). "Immunological synapse: center of attention again." *Immunity* **29**(3): 384-386.
- Valitutti, S., D. Coombs, et al. (2010). "The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse." *FEBS Lett* **584**(24): 4851-4857.
- van den Broek, M. E., D. Kagi, et al. (1996). "Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice." *J Exp Med* **184**(5): 1781-1790.
- van den Brule, F., S. Califice, et al. (2004). "Expression of galectins in cancer: a critical review." *Glycoconj J* **19**(7-9): 537-542.
- van Houdt, I. S., J. J. Oudejans, et al. (2005). "Expression of the apoptosis inhibitor protease inhibitor 9 predicts clinical outcome in vaccinated patients with stage III and IV melanoma." *Clin Cancer Res* **11**(17): 6400-6407.
- Vesely, M. D., M. H. Kershaw, et al. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annu Rev Immunol* **29**: 235-271.
- Vinogradova, O., T. Haas, et al. (2000). "A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1450-1455.
- Vlaminckx, K., L. Vakaet, Jr., et al. (1991). "Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role." *Cell* **66**(1): 107-119.
- von Rahden, B. H., H. J. Stein, et al. (2006). "Overexpression of TGF-beta1 in esophageal (Barrett's) adenocarcinoma is associated with advanced stage of disease and poor prognosis." *Mol Carcinog* **45**(10): 786-794.
- Wakim, L. M., J. Waithman, et al. (2008). "Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues." *Science* **319**(5860): 198-202.
- Wakim, L. M., A. Woodward-Davis, et al. (2010). "Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(42): 17872-17879.

- Wakim, L. M., A. Woodward-Davis, et al. (2012). "The molecular signature of tissue resident memory CD8 T cells isolated from the brain." *J Immunol* **189**(7): 3462-3471.
- Walker, M. R., B. D. Carson, et al. (2005). "De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 4103-4108.
- Walker, M. R., D. J. Kasprowicz, et al. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." *J Clin Invest* **112**(9): 1437-1443.
- Walunas, T., Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1**(5):405-13.
- Wang, C., Y. Li, et al. (2010). "Down-modulation of programmed death 1 alters regulatory T cells and promotes experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neurosci Res* **88**(1): 7-15.
- Wang, F., W. He, et al. (2008). "Activation of Tim-3-Galectin-9 pathway improves survival of fully allogeneic skin grafts." *Transpl Immunol* **19**(1): 12-19.
- Wang, H. Y., D. A. Lee, et al. (2004). "Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy." *Immunity* **20**(1): 107-118.
- Wang, H. Y., G. Peng, et al. (2005). "Recognition of a new ARTC1 peptide ligand uniquely expressed in tumor cells by antigen-specific CD4+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(5): 2661-2670.
- Wang, H. Y. and R. F. Wang (2007). "Regulatory T cells and cancer." *Curr Opin Immunol* **19**(2): 217-223.
- Wang, J., T. Yoshida, et al. (2005). "Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11823-11828.
- Wang, S., J. Bajorath, et al. (2003). "Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction." *J Exp Med* **197**(9): 1083-1091.
- Wang, T., G. Niu, et al. (2004). "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells." *Nat Med* **10**(1): 48-54.
- Wang, W., R. Lau, et al. (2009). "PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells." *Int Immunol* **21**(9): 1065-1077.
- Wang, Y., J. Meng, et al. (2008). "Expression of human TIM-1 and TIM-3 on lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients." *Scand J Immunol* **67**(1): 63-70.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." *Science* **270**(5238): 985-988.
- Webb, J. R., K. Milne, et al. (2014). "Tumor-infiltrating lymphocytes expressing the tissue resident memory marker CD103 are associated with increased survival in high-grade serous ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **20**(2): 434-444.
- Webb, J. R., D. A. Wick, et al. (2010). "Profound elevation of CD8+ T cells expressing the intraepithelial lymphocyte marker CD103 (alphaE/beta7 Integrin) in high-grade serous ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **118**(3): 228-236.
- Weber, J. (2010). "Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade." *Semin Oncol* **37**(5): 430-439.
- Wherry, E. J. (2011). "T cell exhaustion." *Nat Immunol* **12**(6): 492-499.
- Wherry, E. J., J. N. Blattman, et al. (2003). "Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment." *J Virol* **77**(8): 4911-4927.
- Wiedemann, A., D. Depoil, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 10985-10990.
- Wiersma, V. R., M. de Bruyn, et al. (2013). "Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease." *Med Res Rev* **33 Suppl 1**: E102-126.
- Wiesel, M. and A. Oxenius (2012). "From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help." *Eur J Immunol* **42**(5): 1080-1088.

- Wilcox, R. A., A. L. Feldman, et al. (2009). "B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders." *Blood* **114**(10): 2149-2158.
- Wilker, P. R., J. R. Sedy, et al. (2007). "Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family." *Int Immunol* **19**(6): 763-773.
- Willberg, C. B., S. M. Ward, et al. (2007). "Protection of hepatocytes from cytotoxic T cell mediated killing by interferon-alpha." *PLoS One* **2**(8): e791.
- Williams, M. A. and M. J. Bevan (2007). "Effector and memory CTL differentiation." *Annu Rev Immunol* **25**: 171-192.
- Williamson, B. D., E. A. Carswell, et al. (1983). "Human tumor necrosis factor produced by human B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(17): 5397-5401.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* **322**(5899): 271-275.
- Wohlfart, S., D. Sebing, et al. (2004). "FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma." *Am J Pathol* **164**(3): 1081-1089.
- Wolchok, J. D., J. S. Weber, et al. (2013). "Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials." *Ann Oncol* **24**(8): 2174-2180.
- Wolint, P., M. R. Betts, et al. (2004). "Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells." *J Exp Med* **199**(7): 925-936.
- Wong, W. K., H. Robertson, et al. (2003). "Tubulitis in renal allograft rejection: role of transforming growth factor-beta and interleukin-15 in development and maintenance of CD103+ intraepithelial T cells." *Transplantation* **75**(4): 505-514.
- Woo, E. Y., C. S. Chu, et al. (2001). "Regulatory CD4(+)/CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." *Cancer Res* **61**(12): 4766-4772.
- Woodberry, T., T. J. Suscovich, et al. (2005). "Alpha E beta 7 (CD103) expression identifies a highly active, tonsil-resident effector-memory CTL population." *J Immunol* **175**(7): 4355-4362.
- Xie, D. Y., B. L. Lin, et al. (2010). "[Programmed death-1 (PD-1) and PD-L1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B]." *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **18**(9): 646-650.
- Xu, X., P. Clarke, et al. (2000). "Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-interleukin 2 fusion protein." *Cancer Res* **60**(16): 4475-4484.
- Yang, L., D. E. Anderson, et al. (2008). "Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis." *J Immunol* **180**(7): 4409-4414.
- Yee, C., J. A. Thompson, et al. (2002). "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16168-16173.
- Yokosuka, T., M. Takamatsu, et al. (2012). "Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2." *J Exp Med* **209**(6): 1201-1217.
- Yu, P. and Y. X. Fu (2006). "Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?" *Lab Invest* **86**(3): 231-245.
- Zajac, A. J., J. N. Blattman, et al. (1998). "Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function." *J Exp Med* **188**(12): 2205-2213.
- Zatloukal, K., A. Schneeberger, et al. (1995). "Elicitation of a systemic and protective anti-melanoma immune response by an IL-2-based vaccine. Assessment of critical cellular and molecular parameters." *J Immunol* **154**(7): 3406-3419.
- Zeng, W.-p. (2014). "IL-1 in Th17 Differentiation and Inflammatory Tissue Damage." *Austin J Clin Immunol* **1**(2): 4.

- Zhan, P., L. J. Suo, et al. (2011). "Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis." *Eur J Cancer* **47**(5): 742-747.
- Zhang, H. and I. Rosdahl (2006). "Bcl-xL and bcl-2 proteins in melanoma progression and UVB-induced apoptosis." *Int J Oncol* **28**(3): 661-666.
- Zhang, L. and B. Fang (2005). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer." *Cancer Gene Ther* **12**(3): 228-237.
- Zhang, N. and M. J. Bevan (2013). "Transforming growth factor-beta signaling controls the formation and maintenance of gut-resident memory T cells by regulating migration and retention." *Immunity* **39**(4): 687-696.
- Zhang, X. D., A. Franco, et al. (1999). "Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma." *Cancer Res* **59**(11): 2747-2753.
- Zhao, D., C. Zhang, et al. (2008). "In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease." *Blood* **112**(5): 2129-2138.
- Zhong, X., J. R. Tumang, et al. (2007). "PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding." *Eur J Immunol* **37**(9): 2405-2410.
- Zhou, Q., M. E. Munger, et al. (2011). "Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia." *Blood* **117**(17): 4501-4510.
- Zhou, S., H. Ueta, et al. (2008). "Predominant donor CD103+CD8+ T cell infiltration into the gut epithelium during acute GvHD: a role of gut lymph nodes." *Int Immunol* **20**(3): 385-394.
- Zhu, B., I. Guleria, et al. (2006). "Differential role of programmed death-ligand 1 [corrected] and programmed death-ligand 2 [corrected] in regulating the susceptibility and chronic progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **176**(6): 3480-3489.
- Zhu, C., A. C. Anderson, et al. (2005). "The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity." *Nat Immunol* **6**(12): 1245-1252.
- Zimmermann, T., M. Moehler, et al. (2010). "Low expression of chemokine receptor CCR5 in human colorectal cancer correlates with lymphatic dissemination and reduced CD8+ T-cell infiltration." *Int J Colorectal Dis* **25**(4): 417-424.
- Zinselmeyer, B. H., S. Heydari, et al. (2013). "PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis." *J Exp Med* **210**(4): 757-774.
- Zou, W. and L. Chen (2008). "Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 467-477.